

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIA**

**Departamento de Producción Animal**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudios de evolución rápida en microorganismos bajo condiciones selectivas y de cambio global: algunos modelos y aplicaciones en biología**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Beatriz Baselga Cervera**

Directores

**Eduardo Costas Costas**

**Victoria López Rodas**

**Camino García Balboa**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Producción Animal



**ESTUDIOS DE EVOLUCIÓN RÁPIDA EN  
MICROORGANISMOS BAJO CONDICIONES SELECTIVAS  
Y DE CAMBIO GLOBAL: ALGUNOS MODELOS Y  
APLICACIONES EN BIOLOGÍA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Beatriz Baselga Cervera**

Bajo la dirección de los doctores:

Eduardo Costas Costas

Victoria López Rodas

Camino García Balboa

**Madrid, 2017**

© Beatriz Baselga Cervera, 2017





**Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Producción Animal**

# **ESTUDIOS DE EVOLUCIÓN RÁPIDA EN MICROORGANISMOS BAJO CONDICIONES SELECTIVAS Y DE CAMBIO GLOBAL: ALGUNOS MODELOS Y APLICACIONES EN BIOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**BEATRIZ BASELGA CERVERA  
Madrid, 2017**





El Dr. Eduardo Costas Costas y la Dra. Victoria López Rodas, Catedráticos de Genética del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, junto con la Dra. Camino García Balboa, Profesora del Real Centro Universitario María Cristina de El Escorial,

INFORMAN:

Que el trabajo de Tesis titulado: “**Estudios de evolución rápida en microorganismos bajo condiciones selectivas y de cambio global: algunos modelos y aplicaciones en biología**”, ha sido realizado en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra Dirección y que autorizan su presentación para optar al título de Doctor con mención internacional.

Y para que así conste lo firmamos en Madrid a ..... de ..... de dos mil diecisiete:

***Dr. Eduardo Costas Costas***  
Catedrático de Genética  
Dpto. de Producción Animal  
Facultad de Veterinaria. UCM

***Dra. Victoria López Rodas***  
Catedrático de Genética  
Dpto. de Producción Animal  
Facultad de Veterinaria. UCM

***Dra. Camino García Balboa***  
Profesora del Real Centro Universitario  
María Cristina de El Escorial





**Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Producción Animal**

# **ESTUDIOS DE EVOLUCIÓN RÁPIDA EN MICROORGANISMOS BAJO CONDICIONES SELECTIVAS Y DE CAMBIO GLOBAL: ALGUNOS MODELOS Y APLICACIONES EN BIOLOGÍA**

Memoria presentada por  
Beatriz Baselga Cervera  
para optar al grado de Doctor  
con Mención  
Internacional





---

*A mi familia, “...porque el trabajo dignifica,  
pero embrutece”*

---



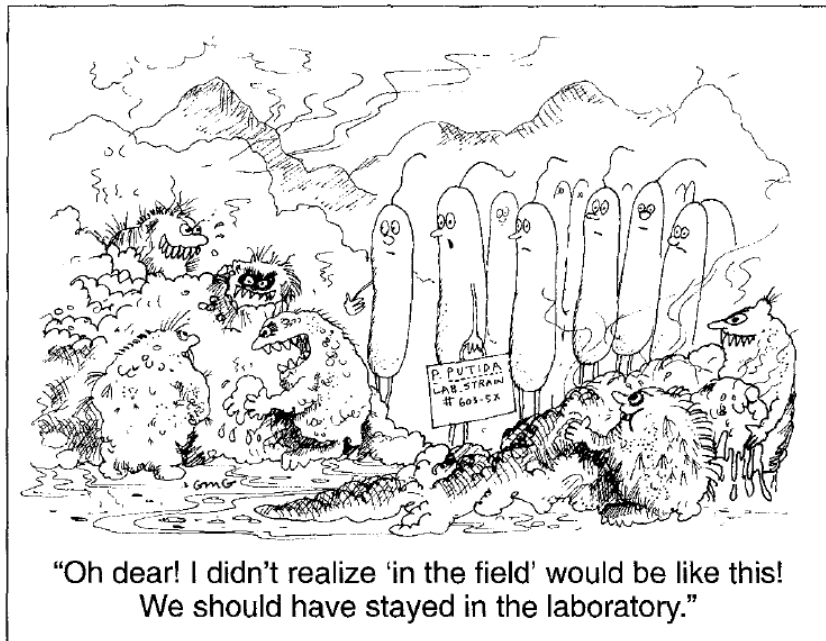


Figura 44.20, Microorganismos evolucionados en el laboratorio en el medio natural.  
Liu & Suflita, 1993. Tibtech, 11:344-352.

-‘Would you tell me, please, which way I ought to go from here?’-asked Alice.

-‘That depends a good deal on where you want to get to’-said the Cat.

-‘I don’t much care where...’-said Alice.

-‘Then it doesn’t matter which way you go’-said the Cat.

-‘...so long as I get *somewhere*’-Alice added as an explanation.

-‘Oh, you’re sure to do that,’ said the Cat, ‘if you only walk long enough...’

Chapter 6, *Alice’s adventures in Wonderland*, Lewis Carrol



---

## AGRADECIMIENTOS

Ya está, se acabó, bueno más bien, la abandono... pero no sin antes llevar a cabo esta sección la cual da sentido a todo este trabajo. Porque son más de cuatro años de mi vida, y el resultado de muchas interacciones, colaboraciones, apoyos, frustraciones y diversión. Espero no extenderme demasiado pero, a fin de cuentas, tengo mucho que agradecer.

A mi familia, en especial a mis padres y hermana, por ser las personas que me han guiado, apoyado y hecho creer que yo era capaz de alcanzar algo si me lo proponía, porque vosotros me multiplicáis. Larga, porque no hay mayor fortuna que tener a tu mejor amiga en la cama de al lado, gracias por esos consejos a tiempo y enredarme hasta en las cosas más inverosímiles, porque todos los caminos van a Roma y todavía nos queda mucho mundo por descubrir. A mis padres, por dejarme hacer todas mis locuras, por aguantarme mis cabezonerías, por perdonarme siempre, por enseñarme que se puede ser feliz solo con una sonrisa y porque pase lo que pase, siempre estáis ahí. A mis abuelos, por su cariño y su experiencia, porque deberían ser eternos. A mis tíos, padrinos y primos, por estar siempre disponibles cuando os necesito y por contar conmigo. Javichu y Anita, espero poder cruzar fronteras pronto. Cuñadísimo, gracias por tu constante preocupación, tus consejos y tu apoyo. A los que no están, por esas sillas vacías. A los que llegan, porque aportan a este gran enjambre familiar. A esos primos-no-primos y tíos que no los son, pero sí. Porque mi familia es un regalo.

Mi segundo “Gracias” es para mis amigos, por haber decidido acompañarme en mi camino. A mis Menchus, Ana, Mati, Marta, Sonso y Carmela, por esos aquelarres de brujitas, porque el roce hace el cariño, la antigüedad es un punto y porqué los amigos de verdad siempre están, incluso cuando tú no estás. A Javi, Moyo y María José, porque los mejores amigos te conocen, muchas veces te devuelven a la tierra y otras te catapultan. Por los Hell Yeah, Iñi, Rebeca, Luis, Maite, Zama... porque lo mismo da un cine, que las Alis, que un juego de mesa, siempre hay un hueco para los amigos y algo que contar. Por los Vets, Carlos, Iago, Rafa, Bea... por interminables horas entre el estudio y la diversión. Por mi compi de prácticas Anita, Maitechu, Reichel, Cogollos y Sonia, por esas cenas que nunca llegan, por nuestro cuasi-interrail, y porque amistades con la misma pasión (o locura), no tienen precio. Por esos veranos interminables con la pandi, por no importar de dónde vienes o a dónde vas, porque no existen amigos de verano, son simplemente grandes amigos, porque ¡NOJA, Sí! Por esos amigos que no esperabas y en cambio te cuidan siempre, Caminante, Estéfano, Larita, Paquito, Richi-Mex, Alberto, Fabio... y por los que te cuidan por extensión.

A mis directores, Eduardo y Victoria, sin los que esta Tesis no habría sido posible. Gracias por vuestra confianza y darme esta oportunidad de iniciarme en la ciencia. Durante estos años he tenido la oportunidad de aprender tanto de mis aciertos, como de mis errores. De expresar mis ideas y tener que retractarme. Por los viajes, estancias, becas, cursos, congresos, experimentos... y sobre todo, por el tiempo dedicado, desde la burocracia, hasta las clases en la pizarra, pasando con las corrigendas y las reuniones. A mi directora Camino, por ese equilibrio entre la dirección y la amistad. Por enseñarme calma, tacto, por solucionarme mis dudas y sacarme de mis cabezonerías. Porque una charla con un café puede aportarte un nuevo punto de vista, la química puede solucionar tus dudas y, la constancia y el rigor dan un trabajo bien hecho. Porque, aunque me toque matar al padre, siempre seréis mis primeros maestros.

A las personas de la Universidad de Málaga y del ICMAN (Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía), por enseñarme los secretos del Fitoplancton y del Mar, siempre me sentí acogida e integrada. Antonio Flores, por acogerme en su casa con los brazos abiertos y tu disponibilidad contante, el mundo de las microalgas sería un poco más oscuro sin tu ayuda.

---

Por tus enriquecedoras charlas, clases, por tu paciencia y diplomacia. Emma Huertas y Javier Ruiz, por vuestro apoyo, confianza e interés, y por facilitarme en todo lo posible llegar hasta este punto.

A los profesores de la Facultad de Veterinaria, Antonio Aralejo, María Teresa Miras Portugal, Bruno González Zorn y Beatriz Isabel Redondo, por su disposición, accesibilidad, amabilidad y buena disposición. A los profesores Córdoba, por respaldarme, alentarme y por vuestra constante preocupación para que las cosas me fueran bien, espero que nuestras colaboraciones sigan adelante. A Laura Muro, Alberto Luengo e Iñaki Urrutia, por descubrirme el mundo de las empresas del agua y el parque de Paiaundi, entre desayunos, madrugones, muestreos y proyectos.

A las personal del laboratorio y del programa de doctorado de la facultad: Lidia, Dani, Raquel, Cris y Eva, Macarena, Alex, Marta, Enrique, Estefano, Lara, Gabriel, Alfonso... porque las horas de laboratorio y de trabajo se hacen más llevaderas entre amigos y buenos compañeros.

Siguiendo un origen cronológico, me gustaría agradecer a las personas con las que trabajé durante mi estancia en la Universidad de Minnesota. Special thanks to Professor Michael Travisano, for your trust, encouragement, guidance and commitment. The five months I spent in the UMN were very enlightening and motivated me pursue my scientific career. I would like to express gratitude to all the member of the MicroPop lab for hosting and helping me. Working with well-prepared people from different backgrounds has been very enriching. Finally, acknowledge the Ecology, Evolution and Behavior department and the University of Minnesota.

Por último, mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de alguna forma, han hecho posible esta Tesis: a los profesionales del CAI de microscopía de la Universidad Complutense, a los científicos del IRNAS-CSIC y al excelente personal de CIEMAT. Mi agradecimiento al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad al conocerme una Ayuda para contratos predoctoral para la formación de doctores (BES-2014-067580), y una ayuda de movilidad predoctoral (EEBB-I-16-10757). Por la beca predoctoral concedida por la UCM y financiada por Iberdrola Engineering and Construction S.A.U. Estas ayudas han supuesto mi soporte económico personal imprescindible durante el desarrollo de esta Tesis. También agradecer las subvenciones de los proyectos: CTM2013-44366-R, CTM2012-34757, diversos proyectos del grupo Abiotox, y a la empresa BES S.L., los cuales han permitido financiar y divulgar esta investigación.

**¡MUCHAS GRACIAS POR HACERLO POSIBLE!**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE .....</b>	<b>1</b>
<b>SIGLAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>III</b>
<b>I.- RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>I.- SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>II.- ESTRUCTURA GENERAL .....</b>	<b>6</b>
CAPÍTULO I. Adaptación del fitoplancton al cambio global.....	6
CAPÍTULO II. Complejidad ecológica dentro de una transición: el origen de la multicelularidad. ....	7
CAPÍTULO III. Modelos de competencia de poblaciones en los ecosistemas acuáticos, dinámicas evolutivas de comportamiento. ....	7
CAPÍTULO VI. Investigación aplicada: aplicaciones en biotecnología relacionadas con el fitoplancton. ....	7
<b>III.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
Introducción general .....	12
La vida en la tierra: una historia microscópica. ....	14
La evolución conjunta de la Tierra y la Vida. ....	14
La vida empezó en el agua .....	17
Los microorganismos como organismos modelos para el estudio de evolución. ....	20
Estudios evolutivos experimentales .....	22
El Antropoceno; la problemática del cambio global. ....	25
Incremento de la temperatura .....	27
Liberación de contaminantes a los ecosistemas. ....	28
Extracción de recursos energéticos: el problema concreto del uranio. ....	29
Eutrofización de las aguas: problemática de los HABs .....	30
Antropoceno: una crisis de biodiversidad. ....	31
El origen de la multicelularidad .....	32
Modelos evolutivos de comportamiento en poblaciones biológicas. ....	34
Teoría de juegos evolutiva .....	34
La biología evolutiva como modelo en economía .....	35
<b>IV.-OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>IV.-OBJECTIVES .....</b>	<b>40</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
Organismos experimentales y condiciones de cultivo .....	44
Técnicas de aislamiento e identificación de microorganismos. ....	49
Parámetros poblacionales de cepas microbianas .....	50
Contaminantes .....	53



Diseños experimentales y metodologías.....	55
1.- Estudios de la adaptación del fitoplancton; respuesta al Antropoceno.....	55
2.- El efecto de la complejidad ecológica en el origen de la multicelularidad.....	62
3.- Modelos de competencia de poblaciones en un contexto evolutivo.....	64
4.- Investigación aplicada: implementar soluciones biotecnológicas relacionadas con el fitoplancton.....	67
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
CAPÍTULO I.....	78
CAPÍTULO II.....	170
CAPÍTULO III.....	174
CAPÍTULO VI .....	202
<b>VII.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>238</b>
El reto de la adaptación del fitoplancton al Antropoceno .....	242
Rebobinado el cassette de la vida, acercamiento a una transición.....	252
Modelos de comportamientos biológicos a la luz de la evolución.....	256
“Mejorando” microorganismos para soluciones biotecnológicas.....	263
<b>VIII.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>271</b>
<b>VIII.- CONCLUSIONS .....</b>	<b>273</b>
<b>XIX.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>275</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>I</b>
APÉNDICE I .....	III
APÉNDICE II .....	IV

## SIGLAS Y ACRÓNIMOS

% v/v	Porcentaje de volumen-volumen
% p/v	Porcentaje de peso-volumen
a.C.	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
BEA	Banco Español de Algas
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> Herramienta Básica Local para Búsquedas de Alineamientos.
CAI	Centro de Apoyo a la Investigación
CE	Concentración Efectiva
CETC	Colección Española de Cultivos Tipo
Chl	Clorofila
ChIU	cepa de <i>Chlamydomonas cf. fonticola</i> mejorada.
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
EDAAG	Espectrometría Directa de Absorción Atómica en Horno de Grafito
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EDSX	<i>Electronic Digital Signal Cross-Connect</i> Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X
EEE	Estrategia Evolutivamente Estable
TJE	Teoría de Juegos Evolutiva
ENUSA	Empresa Nacional del Uranio S.A.
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> Agencia de Protección Ambiental
ec.	Ecuación
ER	<i>Evolutionary Rescue</i> Rescate Evolutivo
ERA	<i>Environmental Risk Assessment</i> Evaluación de Riesgo Ambiental
FMN	Flavin mononucleótido

FSII	Fotosistema II
GO	Gran Oxidación
H <sup>2</sup>	Heredabilidad en sentido amplio
HABs	<i>Harmful Algae Blooms</i> Floraciones de Algas Nocivas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
ICS	<i>International Commission on Stratigraphy</i> Comisión Internacional en Estratigrafía
IOC-UNESCO	<i>Intergovernmental Oceanographic Commission-UNESCO</i> Comisión Oceánica Intergubernamental UNESCO
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i> Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático
ITIS	<i>Integrated Taxonomic Information System</i> Sistema Integrado de Información Taxonómica
ITSM	Incremento de la Temperatura en la Superficie del Mar
JCR	<i>Journal Citations Reports</i> Informes de Citas por Revista
LUCA	<i>Last Universal Common Ancestor</i> Último antepasado común universal
Ma	Millones de años
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MM	Medio Mínimo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NS	No Selección
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de Naciones Unidas
p. ej.	por ejemplo
PAM	Pulso de Amplitud Modulada
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> Buffer fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en Cadena de la Polimerasa
PgC	Pentagramo de Carbono (equivalente a 10 <sup>9</sup> toneladas de carbono)
PNT	Procedimientos Normalizados de Trabajo
PP	Proteínas Fosfatasas
ppm	partes por millón
PSP	<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i> Intoxicación Paralítica por Marisco
RM	Medio Rico
SS	Selección por Sedimentación
ufc	Unidades formadoras de colonias
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.</i> Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
UV	Ultravioleta



## I.- RESUMEN

Los microorganismos son organismos modelo para el estudio de la evolución. Entender los procesos que operan modificando los microorganismos en el tiempo y como estos han transformado los organismos hasta la actualidad, pueden permitirnos abordar la problemática actual de pérdida de diversidad o ayudarnos a entender la complejidad de los organismos contemporáneos. Dentro de los trabajos enmarcados en esta tesis, hemos capitalizado la versatilidad de la evolución experimental como marco de investigación para abordar diferentes cuestiones adaptativas y evolutivas en microorganismos.

Frente al desafío que representa la problemática del Cambio Global, hemos realizado diferentes experimentos de adaptación frente a estresantes antropogénicos (incremento de la temperatura, osmio, berilio y charcas minería de uranio) en el fitoplancton, a lo que se ha sumado un trabajo de revisión del estado actual del conocimiento. Las especies dentro del fitoplancton presentan una capacidad de adaptación diferencial, sin relación directa con el grupo taxonómico o el nicho ecológico. Los resultados obtenidos frente a presiones selectivas intensas, que implica una reducción drástica de la población, indican que la adaptación puede tener lugar gracias a mutantes presentes por azar dentro de las poblaciones naturales. Por tanto, en relación a los efectos del Cambio Global, la diversidad fitoplanctónica puede verse reducida, alterando la biogeografía futura de las poblaciones y favoreciendo a las especies con mayor plasticidad.

Por otro lado, investigamos una transición evolutiva, como es el origen de la multicelularidad, bajo diferentes condiciones ecológicas. Por medio de una selección por sedimentación en *S. cerevisiae*, obtuvimos el fenotipo multicelular *snowflake yeast* a partir de su ancestro unicelular. La restricción nutricional no resultó limitante a la hora de obtener por selección fenotipo *snowflake*, ni implica una reversión hacia la unicelularidad a partir de un fenotipo *snowflake*. Sin embargo, la complejidad de las interacciones entre los organismos y su ambiente, pueden facilitar la persistencia de subpoblaciones (el fenotipo unicelular), así como la expansión de metapoblaciones (persistencia de poblaciones mixtas).

Además, hemos propuesto dos modelos teóricos, abordando comportamientos biológicos dentro de los ecosistemas acuáticos. Mediante teoría de juegos evolutiva, hemos abordado la coexistencia de genotipos productores y no productores de microcistina dentro de un mismo bloom tóxico. Según nuestro modelo de juego, esta coexistencia puede explicarse cómo el resultado de una selección dependiente de frecuencias, sugiriendo comportamientos cooperativos y una función de esta toxina. El segundo modelo hace una aproximación desde teoría económica, asumiendo que las conductas expuestas por los animales optimizan su ingesta de energía y están bajo acción de la selección natural. En nuestro modelo, al incrementarse el precio del bien básico (el fitoplancton), la demanda del mismo se ve incrementada para cubrir los requerimientos energéticos, emulando a los bienes Giffen. Nuestros estudios experimentales han desvelado conductas análogas al comportamiento Giffen en las condiciones que impone el modelo.

Por último, partiendo de cepas aislados a partir de ambientes extremos, hemos llevado a cabo procesos de selección artificial y estudios funcionales en relación a

posibles aplicaciones biotecnológicas. Hemos obtenido una cepa de *Raoutella planticola* capaz de utilizar microcistina como única fuente de carbono y de degradar hasta 2,5 ppb de microcistina en agua. Con esta cepa, desarrollamos un biofiltro para eliminar activamente microcistina en agua. Análogamente, hemos obtenido una cepa mejorada de *Chlamydomonas cf. fonticola* capaz de captar hasta 10 mg de uranio por gramo de biomasa seca y producir fraccionamiento isotópico en el proceso de bioacumulación.

## I.- SUMMARY

Globally, microorganisms play a key role in the maintenance of biogeochemical cycles and the status of ecosystems, particularly in aquatic environments where they act as primary producers. Microorganisms serve as model organisms for the study of evolution, they present an inherent importance due to its ecological role, ubiquity, its adaptive antecedents and preponderance throughout evolution. Understanding the processes that operate by modifying microorganisms over time and how they have modify living organisms until today, would enable as to tackle the current rate of loss of biological diversity or help us understand the complexity of contemporary organisms. Evolutionary processes can be address via experimental evolution, by means of controlled field or laboratory experiments. Evolution experiments make use of different organisms, often microorganisms, to examine evolutionary hypothesis, study adaptive processes and approach populations dynamics. Taking advantage of this methodology we can approach the issue of global change or to address evolutionary questions.

Anthropogenic activities have reshaped and modified the ecosystems and the biosphere globally, becoming the current driving evolutionary force. In particular, is of primarily importance to study the effect of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems. Phytoplankton is the base of the aquatic ecosystems, responsible of a significant amount of the atmospheric oxygen and plays an essential part in the “biological pump”, regenerating the atmospheric composition. Temperature increase and acidification, both in marine and freshwater environments, is a direct threaten to the aquatic ecosystems and indirectly to all the living forms on earth. Also the release of stressors, especially heavy metals, in aquatic environments result in a direct hazard to living forms, entailing a serious risk for the environments and human health. Phytoplankton is the base of the aquatic ecosystems, responsible of a significant amount of the atmospheric oxygen and plays an essential part in the “biological pump”, regenerating the atmospheric composition. Approaching this nowadays problem form the phytoplankton perspective is useful to address the problematic of anthropogenic pollutants and have direct implications in the ambit of environmental risk assessment.

Likewise, by means of experimental evolution, ecological and evolutionary questions can be investigated. We have tackled one of the mayor evolutionary transitions, the origin of multicellularity. Despite the remarkable importance of this transaction, multicellular origin and early develop still poorly understood. From an ecological perspective, we have evolved a unicellular microbe under different environmental conditions to address possible selection driver and barriers. Additionally, based in experimental research and field observations, we have propose different theoretical models to explain biological behavior patterns in aquatic ecosystems from an evolutionary perspective. Finally, as a result from the field studies, we have isolated different microbial strains from extreme environments. Extremophiles thrive under detrimental conditions for the majority of living forms. Extremophiles features and enzymes have tremendous potential for biotechnological applications. These strains have been selected and studied for its functionalities with a biotechnological perspective. As research framework, the studies presented in this thesis capitalized on the versatility of experimental evolution to investigate different adaptive and evolutionary issues in microorganisms.



Facing the challenge of the loss of biological diversity resulting from global anthropogenic change, it is of interest to study the adaptive responses of phytoplankton populations as primary producers within aquatic ecosystems. To this end, we have carried out different adaptation studies to stressors of anthropogenic origin (temperature increase, osmium, beryllium and uranium mining extreme environments) and a review work. The different species within the phytoplankton have a differential adaptation capacity facing temperature increases, without direct relation with the taxonomic group or the ecological niche. The results, by means of the fluctuation analysis, indicate that phytoplankton adaptation can take place thanks to mutants that arose randomly present at low frequency within the natural populations, after population decline induced by an intense selective pressure. In addition, variability generated by genetic recombination during sexual reproduction may accelerate adaptation to anthropogenic extreme environments. Therefore, in relation to global change, phytoplankton diversity can be reduced, altering the future biogeography of the populations and promoting the species with greater plasticity.

Furthermore, we investigate an evolutionary transition, such as the origin of multicellularity, under different ecological conditions. Through settling selection in *S. cerevisiae*, we obtained the multicellular snowflake yeast phenotype from its unicellular ancestor. The nutritional restriction was not limiting of the evolution of phenotype snowflake yeast, nor does it imply a reversion towards the unicellularity from the multicellular snowflake phenotype. However, environmental differences may lead to different outcomes in the evolution towards multicellularity. Complex interactions between organisms and their environment can facilitate the persistence of subpopulations (in our case the single cell phenotypes), as well as the expansion of metapopulations (persistence of the mixed population, unicellular and snowflake yeast phenotypes). In addition, we have proposed two theoretical models, based on experimental results, addressing biological behaviors within aquatic ecosystems. Through evolutionary game theory, we have approached the coexistence of microcystin producing and non-producing genotypes within the same HAB. According to our game model, this coexistence can be explained as the result of a frequency-dependent selection, suggesting a cooperative behavior and a biological function associated to microcystin production. The predominance of the toxic genotypes within a HAB can be explained by kin selection. The second model makes an approach from economic theory, we consider that animal's behaviors optimize their energy intake and therefore are under natural selection pressure. Our behavior model studies the sea as an economic market, sardines as subsistence consumers and phytoplankton as the basic good. In economic terms of energy optimization, as the price of the basic good increases and the demand increases to cover the energy requirements, the basic good behaves as described in the Giffen goods. Our experimental studies have identified behaviors analogous to Giffen under the conditions imposed by the model. Therefore, this type of behavior may be an adaptive advantage, and be under evolutionary pressure.

Finally, as a result of the basic research studies, we isolated microorganisms from extreme environments, with particular metabolic or biochemical features. We have carried out genetic enhancement experiments by artificial selection and functional studies in these strains, in relation to possible biotechnological applications. We obtained a strain of *Raoutella planticola* that utilize microcystin as a sole carbon source, and able of biodegrade up to 2.5 ppb of microcystin in water. We developed a biofilter to actively remove microcystin in water with this strain, which has been successfully tested by different Water companies. Similarly, we obtained an improved strain of *Chlamydomonas*

*cf. fonticola* capable of remove up to 10 mg of uranium per gram of dry biomass and producing isotopic fractionation in the bioaccumulation process.

## II.- ESTRUCTURA GENERAL

La presente memoria expone los resultados originales obtenidos durante la investigación de tesis doctoral agrupados en diferentes trabajos de investigación básica y aplicada, expuestos en forma de: i) artículos científicos, publicados o en trámites de publicación en diversas revistas contenidas en el *Journal Citations Reports* (JCR), ii) publicaciones en revista de sociedades de ámbito nacional y, iii) modelos de utilidad en diferente estado de tramitación, utilización y comercialización. Asimismo, se incluye una introducción general revisando el tema planteado y se proponen unos objetivos. Finalmente se presenta una discusión integrada de los resultados y unas conclusiones.

Los resultados se presentan divididos en 4 capítulos:

### ➤ CAPÍTULO I. Adaptación del fitoplancton al cambio global.

#### I.I. Adaptación diferencial del fitoplancton a los posibles escenarios de calentamiento global.

Eduardo Costas, Emma Huertas, **Beatriz Baselga-Cervera**, Camino García-Balboa & Victoria López-Rodas, (2014). Phytoplankton Ability to Physiological Acclimatization and Genetic Adaptation to Global Warming. *International Journal of Biology* 6 (4), 24-36. DOI: 10.5539/ijb.v6n4p24

Eduardo Costas, **Beatriz Baselga-Cervera**, Camino García-Balboa & Victoria Lopez-Rodas, (2014). Estimating the genetic capability of different phytoplankton organisms to adapt to climate warming. *Oceanography: Open Access*. DOI: 10.4172/2332-2632.1000123

#### I.II. La evolución rápida como respuesta a escenarios de estrés antropogénico.

**Beatriz Baselga-Cervera**, Victoria López-Rodas, Camino García-Balboa, Emma I. Huertas Cabilla & Eduardo Costas, (2016). Mechanisms of Rapid Adaptation to Environmental Stressors in Phytoplankton. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*. 6(5): 2161-0525. DOI: 10.4172/2161-0525.1000405.

Fernando Marvá, Camino García Balboa, **Beatriz Baselga-Cervera**, & Eduardo Costas, (2014). Rapid adaptation of some phytoplankton species to osmium as a result of spontaneous mutations. *Ecotoxicology*, 23: 213-220. DOI: 10.1007/s10646-013-1164-8.

**Beatriz Baselga-Cervera**, Eduardo Costas, Estefano Bustillo-Avendaño & Camino García-Balboa, (2016). Adaptation prevents the extinction of *Chlamydomonas reinhardtii* under toxic beryllium. *PeerJ* 4, e1823. DOI: 10.7717/peerj.1823.

Camino García-Balboa, **Beatriz Baselga-Cervera**, Antonio García-Sanchez, José Mariano Igual, Victoria López-Rodas & Eduardo Costas, (2013). Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how

mesophilic organisms can rapidly colonize extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology*, 144– 145: 116– 123. DOI: 10.1016/J.Aquatox. 2013.10.003.

➤ **CAPÍTULO II. Complejidad ecológica dentro de una transición: el origen de la multicelularidad.**

**Beatriz Baselga-Cervera** et al. Ecological complexity within a transition: evolution of multicellularity (In preparation).

➤ **CAPÍTULO III. Modelos de competencia de poblaciones en los ecosistemas acuáticos, dinámicas evolutivas de comportamiento.**

**Beatriz Baselga-Cervera**, Camino García-Balboa, Eduardo Costas & Victoria López-Rodas, (2014). Why Cyanobacteria Produce Toxins? Evolutionary Game Theory Suggests the Key. *International Journal of Biology* 7 (1): 64-77. DOI: 10.5539/ijb.v7n1p64.

Eduardo Costas, **Beatriz Baselga-Cervera**, Camino García-Balboa & Victoria López-Rodas, (2015). Evolutionary Control of Economic Strategy in Fishes: Giffen Behaviour could be a Common Economic Strategy on the Earth. *Oceanography* 3 (131): 2-10. DOI: 10.4172/2332-2632.1000131.

➤ **CAPÍTULO VI. Investigación aplicada: aplicaciones en biotecnología relacionadas con el fitoplancton.**

**VI.I. Un abordaje biotecnológico a la problemática de los HABs**

Camino García Balboa, Lara de Miguel Fernández & **Beatriz Baselga Cervera**.

Título: Bacteria degradadora de microcistina, biofiltro que la incluye así como método de depuración de aguas contaminadas con microcistina empleando el mismo

Número de publicación: ES2529362 A1 (19/02/2015)

Número de solicitud: P201300701 (29/07/2013)

Dueño de la patente: Biotechnological Environmental Solutions S.L. B86701901

Clasificación internacional: C12N1/20 (2006.01), B01D29/00 (2006.01), C02F3/32 (2006.01) y C12R1/22 (2006.01).

**Baselga-Cervera** et al. Development and performance of *Raoutella planticola* biofilter for microcystin LR removal. (In preparation).

**VI.II. Vivir recuperando y enriqueciendo Uranio**

**Beatriz Baselga-Cervera**, Victoria Lopez-Rodas, Camino García-Balboa & Eduardo Costas, (2013). Microalgae: the first nuclear engineers? *Anales del a Real Academia de Farmacia* 79(4): 634-645.

Eduardo Costas, **Beatriz Baselga-Cervera**, Camino García-Balboa & Victoria López-Rodas. Genetically enhanced *Chlamydomonas sp.* for uranium uptake; a joint biological approach on uranium-contaminated waters management. (In preparation).

Eduardo Costas, **Beatriz Baselga**, & Francisco Tarín, (2015). Un Nuevo procedimiento para el fraccionamiento de Uranio. *Nuclear España* 360, 74-77. ISSN: 1137-2885.

Eduardo Costas Costas, Victoria López Rodas, Camino García Balboa, Lara de Miguel Fernández & **Beatriz Baselga Cervera**.

Título: “Método de recuperación y enriquecimiento de uranio mediante bioacumulación en microalgas mejoradas genéticamente”.

Número de publicación: ES2531010 A1 (09.03.2015)

Número de solicitud: P201201203 (04.12.2012)

Dueño de la patente: Universidad Complutense de Madrid.

Clasificación internacional: G21F9/18 (2006.01), C02F3/32 (2006.01)

Número PCT internacional: PCT/ES/2013/000267.

## II.-Estructura General

### III.- INTRODUCCIÓN

*Por “vida” queremos decir una cosa capaz  
de alimentarse, crecer y deteriorarse.*

Aristóteles (384 a.C.-322 a.C.)

### III.-Introducción



## Introducción general

La vida es un puzzle no-resuelto excesivamente complejo. La vida, tal y como la conocemos hoy en día, es el resultado de un conjunto de procesos adaptativos y de azar que han ido dando forma a los organismos. A partir del último ancestro común universal (*last universal common ancestor*, LUCA), que por divergencia es el origen de todas las formas de vida contemporáneas (Koskela & Annala, 2012), los procesos evolutivos han dado lugar a toda la biodiversidad de especies y organismos. No obstante, la evolución es un proceso continuo. Los organismos se encuentran dentro de una “carrera” constante para mantenerse en el mismo sitio<sup>1</sup> es decir, están constantemente adaptándose para perdurar en los ecosistemas junto con los que co-evolucionan.

La principal fuerza evolutiva es la selección natural. Se trata de un proceso de ensayo riguroso que filtra aquello que funciona de lo que no, siendo agente del cambio evolutivo y responsable de las adaptaciones de los organismos al medio donde habitan. La capacidad de las poblaciones para desarrollar cualquier tipo de evolución adaptativa, viene determinada por su grado de diversidad genética. Entendiendo como evolución adaptativa cuando la selección actúa sobre una población dentro de un contexto espacio-temporal, favoreciendo la fijación de genes capaces de optimizar el desempeño ecológico y reproductivo (Donoso 2012). En el caso de las poblaciones microbianas la variación genética existente está determinada por la aparición de mutaciones al azar o procesos de intercambio genético, siendo sobre esta variación sobre la que actúa la selección natural. Sin embargo, los eventos al azar también tienen un rol importante en el proceso evolutivo. Desde la aparición de la vida en la tierra hace aproximadamente 4 mil millones de años (Ma) (Patterson, Tilton, & Inghram, 1955), se estima que más del 90% de todas las especies que han poblado la tierra se extinguieron (Novacek, 2001). Por tanto, entender los procesos que operan modificando a las especies a lo largo del tiempo y como éstos han transformado la vida hasta nuestros días, puede ayudarnos a entender la complejidad de los organismos contemporáneos o abordar la problemática de la crisis de diversidad actual (Kolbert, 2014). Esta Tesis, a grandes rasgos, estudia procesos evolutivos naturales y experimentales. En particular, la adaptación del fitoplancton al cambio global y cuestiones evolutivas, como el origen de la multicelularidad.

En este documento, en líneas generales, vamos a abordar la capacidad de adaptación de los microorganismos de los ecosistemas acuáticos al cambio global. Concretamente, estudiando la varianza genotípica inicial, los fenómenos de expansión clonal, en algunos casos el efecto de la recombinación sexual y las consecuencias del estrés ambiental sobre diferentes grupos ecológicos. Estos estudios nos permitirán hacer predicciones sobre la respuesta de las poblaciones fitoplanctónicas a posibles escenarios futuros. De forma paralela, vamos a abordar la dicotomía de la “velocidad” de la adaptación entre el gradualismo y el equilibrio puntuado, utilizando microorganismos. Aunque la adaptación se considera un proceso lento, bajo fuertes presiones selectivas como es el estrés ambiental, los microorganismos pueden llegar a adaptarse rápidamente presentando implicaciones para la continuidad de las especies y los ecosistemas (Bell & Collins, 2008; Lankau, Jørgensen, & Harris, 2011; Lavergne, Mouquet, & Thuiller, 2010). Estos procesos tienen especial implicación en fenómenos de rescate evolutivo evitando la extinción local (Orr & Unckless, 2014), y constituye otro de los objetivos planteados en esta Tesis. El estudio de la

---

<sup>1</sup> Hipótesis de la Reina Roja de Leigh Van Valen (1973). Hipótesis evolutiva sobre la necesidad de adaptación continua de las especies basada en una analogía a la novela “Alicia a través del espejo” de Lewis Carroll.

### III.-Introducción

adaptación nos permite obtener información sobre la capacidad de adaptación diferencial de distintas especies microbianas frente a diversas presiones selectivas.

El segundo aspecto general de esta Tesis, consiste en el abordaje de cuestiones evolutivas concretas a través de estudios de evolución experimental. Los estudios evolución experimental en microorganismos, de forma transversal con otras áreas de conocimiento (p.ej. la economía o la teoría de juegos), permiten abordar desde cuestiones biológicas hasta desarrollos matemáticos. Por medio de estudios evolutivos experimentales, vamos a abordar una de las grandes transiciones en evolución (Maynard Smith and Szathmary 1997), como es el origen de la multicelularidad y algunas de las posibles limitaciones que determinaron este salto evolutivo.

En el terreno teórico, haciendo uso de teoría de juegos evolutiva (TJE) o de modelos económicos, hemos propuestos dos modelos para explicar comportamientos de competencia en poblaciones dentro de los ecosistemas acuáticos (Vincent & Brown, 2005), tanto en fitoplancton como en peces, basados en datos experimentales obtenido en esta Tesis y a partir de la literatura científica. Estos modelos hacen un abordaje teórico y matemático de dinámicas de comportamiento desde una perspectiva evolutiva.

Finalmente, proponemos la utilización de cepas microbianas adaptadas para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, como objetivo aplicado derivado de los trabajos de investigación básica. Por medio de estudios experimentales de adaptación obtenemos microorganismos seleccionados de manera directa para un determinado ambiente (Baos et al., 2002; Lopez-Rodas et al., 2001). Valorar la potencialidad de los microorganismos evolucionados frente a problemas ambientales, conforma el objetivo aplicado del presente trabajo. Dentro del programa *Horizonte 2020* de la Unión Europea, tres de los siete objetivos específicos están relacionados con el cambio global: Acción por el clima, medio ambiente, eficiencia de los recursos y materias primas; Seguridad alimentaria, agricultura y silvicultura sostenibles, investigación marina, marítima y de aguas interiores y bioeconomía; Energía segura, limpia y eficiente. Los estudios resultantes en esta Tesis pueden contribuir a expandir el conocimiento sobre las implicaciones del cambio global, e identificar soluciones basadas en la naturaleza a problemas de contaminación antropogénica concretos.

En este capítulo de introducción enmarcaremos los trabajos de investigación realizados dentro del contexto científico de la biología evolutiva. A continuación se expone una breve descripción de la evolución de la vida en la tierra como antecedente. Introduciremos los microorganismos y los estudios evolución experimental, como el principal objeto y/o medio y el método de estudio de esta memoria. Posteriormente, presentaremos brevemente i) la problemática del Antropoceno como reto adaptativo para las especies, ii) el origen de la multicelularidad como una transición evolutiva y iii) modelos de comportamiento en biología evolutiva, como principales cuestiones abordadas en esta Tesis.

## ➤ La vida en la tierra: una historia microscópica.

Actualmente, la Tierra es el único cuerpo astronómico donde se conoce la existencia de vida (Purves, Sadava, Orians, & Heller, 2001). La Tierra se formó hace aproximadamente unos 4.567 Ma (Allègre, Manhès, & Göpel, 1995; Dalrymple, 2001) y mil millones de años más tarde surgió la vida (Mojzsis, Arrhenius, McKeegan, & Harrison, 1996). La historia de la Tierra y la evolución de la vida están íntimamente conectadas: desde el surgimiento de la vida, las condiciones abióticas de la Tierra (como p.ej. la atmósfera), han sido significativamente alteradas por la biosfera del planeta. Pero hay que tener en cuenta que la historia de la vida es predominantemente microscópica, siendo la única forma de vida existente a lo largo del supereón Precámbrico, durante más del 80% de la historia de la vida, y continúa siendo el tipo de vida mayoritario en la actualidad. Además, los microorganismos sustentan la vida en la tierra por medio de infinidad de asociaciones e intervienen de forma decisiva en los ciclos biogeoquímicos (Gilbert et al., 2014). Como Louis Pasteur predijo, la vida como la conocemos no sería posible con la ausencia de microbios (Pasteur, 1885).

### *La evolución conjunta de la Tierra y la Vida.*

Resulta tremendamente ambicioso pensar que podemos resumir en una serie de párrafos los eventos principales de los 4.567 Ma de historia de la Tierra y su relación con la evolución de la vida (los saltos evolutivos (Payne et al., 2009) y las grandes transiciones (“*The major transitions in evolution*” (Maynard Smith & Szathmary, 1995)); no obstante, vamos a llevar a cabo un humilde acercamiento destacando los eventos más significativos.

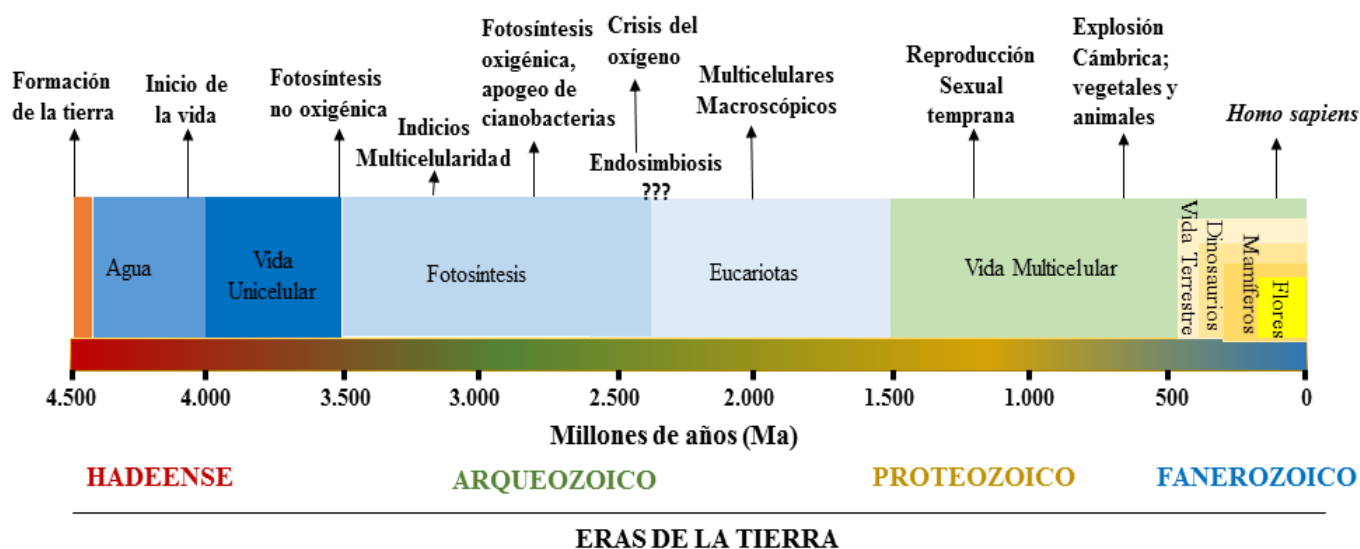


Figura 1. Escala geológica de la tierra desde sus orígenes y los principales saltos evolutivos y transiciones de la vida.  
Fuente: Elaboración propia.

Numerosas hipótesis se han postulado para explicar el origen de la vida a partir de la no existencia de ésta o abiogénesis. Pese a que no existe un consenso en la comunidad científica, se presupone que procesos químicos altamente energéticos que tuvieron lugar en el medio acuático, dieron lugar a una molécula auto replicable (Miller and Urey 1959; Miller 1953). Así mismo, se han encontrado indicios de la existencia de un antepasado común universal (LUCA), que ha dado lugar a todas las formas de vida actuales y que debió existir entre 3800 y 3500 Ma (Koskela & Annala, 2012; Woese, 1998). Al principio del eón Arqueozoico, característico por su diversidad metabólica, había una atmósfera reductora primigenia prácticamente sin oxígeno, muy propicia para la formación de moléculas

### III.-Introducción

complejas por asociación de otras más simples. Se supone que las primeras especies vivas eran algún tipo de proto-bacterias unicelulares, sin membrana externa que vivían en los océanos calientes del planeta. Los primeros indicios de vida se encuentran en los fósiles de estromatolitos (presentan una antigüedad de más de 3,5 Ma (Walter, Buick, & Dunlop, 1980)), que se fueron haciendo más comunes al final del eón (Allwood, Walter, Kamber, Marshall, & Burch, 2006; Lepot, Benzerara, Brown, & Philippot, 2008). Hace unos 3.500 Ma, surgieron organismos procariotas que empezaron a realizar la fotosíntesis no oxigénica, siendo los ancestros de las actuales bacterias azufre-reductoras que hoy denominamos arqueobacterias. Además, en este periodo hace aproximadamente 3,5-3 miles de Ma, se han encontrado los primeros indicios de organismos asociados microscópicos (Schopf 1993). No sería hasta hace unos 2800 Ma, cuando surgieron los primeros organismos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica; las cianobacterias primitivas. Durante el eón Arqueozoico la atmósfera fue cambiando, incrementando su nivel de nitrógeno y disminuyendo en metano y en dióxido de carbono. El aporte de las bacterias que llevaban a cabo la fotosíntesis oxigénica mediante hidrólisis del agua, en los primeros momentos no generó un incremento importante de oxígeno. Pero poco a poco fueron saturando los nichos dando lugar a la Gran Oxidación (GO) (Cavalier-Smith, Brasier, & Embley, 2006), hace aproximadamente 2.400 Ma, y supuso el inicio del eón Proteozoico (Sleep, 2001).

El eón Proteozoico, se caracteriza por tener la GO como punto de partida (Holland 2006) y el comienzo de la formación de la capa de ozono, que permitió la posterior colonización de la vida sobre la superficie terrestre (Cockell et al., 2000). Los cambios climáticos de este eón se debieron a la reducción de la cantidad de metano atmosférico (principalmente producido por organismos anaerobios), que fue sustituido por CO<sub>2</sub>, cuyo potencial efecto invernadero es menor. Esto llevó a un descenso drástico de la temperatura y a la Glaciación Huroniana, hace aproximadamente 2.400 años. Así mismo, las emisiones de oxígeno dieron lugar a una crisis ecológica (una extinción masiva de diversidad), puesto que el oxígeno era tóxico para los grupos de organismos anaerobios dominantes. Sin embargo, esta transformación dio lugar a una oportunidad para la diversificación biológica. La disponibilidad de oxígeno supuso un avance en la evolución del metabolismo aumentando la disponibilidad de energía, hasta ahora limitada. Desde el punto de vista de la vida, tuvo lugar la expansión de las cianobacterias y, durante este periodo, se encuentra la mayor abundancia y diversidad de estromatolitos. Dentro de este marco temporal, aparecieron los primeros organismos eucariotas en torno a 2-2,7 mil Ma (Knoll et al. 2006), por medio de la incorporación simbiogenética de procariotas de vida libre siendo los antecesores de las mitocondrias y los cloroplastos (Sagan, 1967). Hace aproximadamente 2,1 mil Ma, se han encontrado los primeros fósiles de organismos multicelulares macroscópicos (El Albani et al., 2010). También en este periodo tuvo lugar la aparición de la reproducción sexual (hace en torno a 1.200 Ma (Butterfield, 2000)) y hace 760 Ma, también se han encontrado los primeros indicios de diferenciación celular (Tomitani et al. 2006; Chen et al. 2014). Hasta este punto, englobando el supereón precámbrico, la vida era microscópica.

La llegada del eón Fanerozoico, refiriéndose al tamaño de los organismos que surgen en esta época, se extiende desde 542 Ma hasta nuestros días. Este periodo se abre camino con la explosión del Cámbrico, el descubrimiento de los primeros fósiles animales (p. ej. Trilobites) y la llamada “Glaciación global” (la teoría de *Snowball Earth* (Jenkins & Smith, 1999)). Los organismos comienzan a proliferar evolucionando en formas complejas diversificándose ampliamente, constituyendo el auge de los macroorganismos. Además a lo largo de este periodo, según el registro fósil, han tenido lugar las cinco grandes extinciones

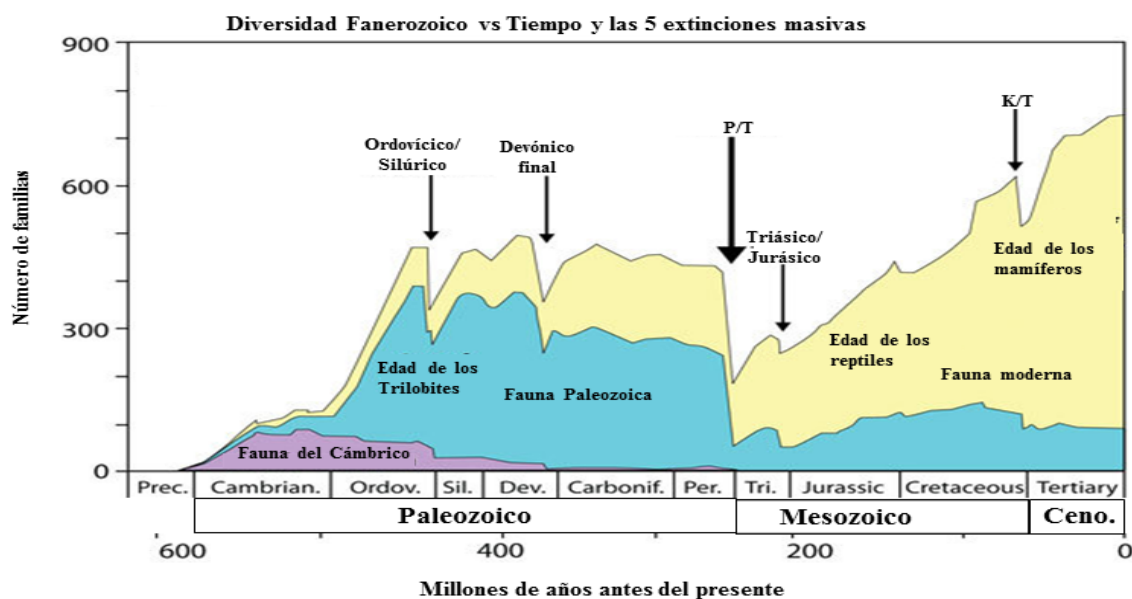


Figure 2. Representación gráfica de la diversidad y abundancia de especies en el registro fósil con respecto al tiempo y a las Cinco Grandes Extinciones masivas. Las Cinco Grandes Extinciones ocasionaron fuertes reducciones de la diversidad a nivel del número de familias. Fuente: adaptada de David M. Raup y J. John Sepkoski Jr./ *Science*, 215 (1982), p. 1502 (Raup & Sepkoski, 1982).

en masa<sup>2</sup>, representadas en función de la pérdida de diversidad en la figura 2 (Raup and Sepkoski 1982).

El Fanerozoico se caracteriza por ser una era de glaciaciones y periodos interglaciares “cálidos”, y se divide en tres eras principales; i) el Paleozoico (de 570 a 249 Ma atrás): donde la vida florece en los mares y aparecen los primeros animales de respiración aérea, abarca desde la proliferación de animales con concha hasta los grandes reptiles, peces de escamas, anfibios, primeros insectos voladores y plantas (los bosques de helechos). ii) El Mesozoico (de 248 a 66 Ma atrás): se caracterizó por el auge de los vertebrados, en especial los reptiles (dinosaurios). Aparecen las aves, los mamíferos y las plantas con flores (angiospermas). Al final de este periodo, tiene lugar la última gran extinción registrada, la del Cretácico tardío, extinguiéndose la mayoría de los dinosaurios, reptiles tanto voladores, como acuáticos y los ammonites, sobreviviendo los organismos más pequeños, las aves y los mamíferos. iii) El Cenozoico (desde hace 65 Ma): caracterizado por la proliferación y diversificación de los mamíferos. Hace aproximadamente 30 Ma, surgieron los primeros ancestros del orden de los primates, y posteriormente, en torno a hace 200.000 años, surgió el *Homo sapiens* presentando lo que se define como “comportamiento moderno”<sup>3</sup>. El Holoceno, que comenzó hace unos 10.000 años, gracias a su climatología estable ha permitido la expansión de las civilizaciones humanas. Recientemente, una comisión dentro de la Comisión Internacional de Estratigrafía (ICS, *International Commission on Stratigraphy*, por sus siglas en inglés), ha recomendado

<sup>2</sup> Elisabeth Kolbert describió la historia de la vida como “*long periods of boredom interrupted occasionally by panic*” (Kolbert, 2014). En general las especies presentan un ritmo de desaparición lento, denominada tasa de “extinción de fondo”. Sin embargo, en determinados momentos tienen lugar eventos de extinción en masa: pérdidas sustanciales de la biodiversidad en fracciones temporales insignificantes y que tienen una extensión global. Basándonos en el registro fósil, se considera que ha habido Cinco Grandes Extinciones masivas a lo largo de la historia de la Tierra (Raup & Sepkoski, 1982), aparte de numerosas extinciones menores, suponiendo una pérdida de biodiversidad extrema que cambiaron profundamente la Tierra.

<sup>3</sup> Referido a los rasgos de comportamiento que evidencian capacidades que nos identifica como *Homo sapiens*, es decir como nuestra especie (rasgos sintetizados por Henshilwood y Marean (2003)).



### III.-Introducción

la declaración del Antropoceno como periodo geológico actual. El Antropoceno se plantea como la época geológica caracterizada por el papel del ser humano como agente de cambio a escala global. Pese a todo, el Antropoceno todavía no forma parte oficialmente del rompecabezas geológico.

La vida apareció en un planeta convulso, con condiciones y clima extremos, y su historia ha estado salpicada por episodios catastróficos y crisis de biodiversidad. Sin embargo, la vida, desde su aparición, ha sido capaz de abrirse paso y perdurar, colonizando nuevos nichos ecológicos y adaptándose. Por ejemplo las cianobacterias llevan existiendo más de 3.000 Ma (Schirrmeister, Gugger, & Donoghue, 2015). Los microorganismos fueron las primeras formas de vida de la tierra, y el planeta estuvo y sigue estando dominado por formas de vida microscópicas (Stanley, 1973). Además, la mayoría de los eventos importantes en la historia de la vida, por ejemplo la aparición de los organismos eucariotas o los múltiples orígenes de la pluricelularidad (Grosberg & Strathmann, 2007), tuvieron lugar en un mundo microscópico. Por lo tanto, la historia de la vida en la tierra es un historia microbiana (Pace 2001).

#### *La vida empezó en el agua*

*El agua líquida, el sine que non de la vida en la tierra.* Todas las teorías sobre la biogénesis apuntan a un “mundo de agua”, siendo el soporte donde tuvieron lugar las reacciones químicas que permitieron la vida. Además, el agua es el componente mayoritario de los seres vivos (oscilando entre un 65%-95%) e interviene en la mayor parte de los procesos metabólicos que tienen lugar en los organismos, haciendo de ésta el elemento más importante para la vida en la tierra. A nivel ecológico el agua representa aproximadamente más del 71% de la superficie de la tierra, generando la mitad de la producción primaria del Planeta. Aunque el agua es el elemento más frecuente en el planeta, solo un 2,53% es agua dulce (del cual dos terceras partes están inmovilizadas en forma de hielo). Dentro de los ecosistemas acuáticos, pueden diferenciarse dos grupos principales; los ecosistemas marinos y los ecosistemas de agua dulce o continentales.

Los ecosistemas marinos están compuestos por los mares, océanos y zonas costeras. Los ecosistemas marinos representan el 97,4 % del agua presente en la superficie terrestre (Barange et al., 2010). Se han realizado estimaciones que determinan que el 80% de la vida del planeta depende directamente del estado (“salud”) de los océanos (Barange et al., 2010). El océano llega a contribuir con la producción primaria en más de un 35% (Pennington *et al.*, 2006). Esta tasa tan baja, comparativamente, se debe a que la intensidad de la energía lumínica disminuye con la profundidad. Siendo las zonas costeras, las cuales solo ocupan el 12% de la superficie marina, las más productivas en comparación con el mar abierto. Los océanos aportan la mayor parte del agua que se evapora debido a la acción de la energía solar, permitiendo la lluvia. Dentro de los océanos, se acumula y sirve de reserva de CO<sub>2</sub>, regulando la temperatura global (Costanza, 1999), actuando como una “bomba biológica”.

Los ecosistemas continentales corresponden a las aguas superficiales; como ríos, embalses, lagos, marismas, charcas etc. Los ecosistemas de agua dulce representan 0,8% de superficie del planeta (Dajoz, 1974) y contienen únicamente el 0,1% del agua total (McAllister, Hamilton, & Harvey, 1997)), sin embargo pese a su reducida extensión, albergan una gran variedad de organismos (se estima que alrededor del 40% de la diversidad de peces y en torno al 25% de los vertebrados (Lundberg, Kottelat, Smith, Stiassny, & Gill, 2000)). Además, a pesar de su escasa representación a nivel global, contribuye significativamente a la producción primaria (en torno al 3% (Alexander & Fairbridge, 1999)).

Los ecosistemas acuáticos no son solo importantes a nivel ecológico y debido a los organismos acuáticos que contienen, muchos organismos terrestres incluido el hombre, dependen de este recurso para su supervivencia. El informe de Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo de 2015 (The World Water Development Report), en su análisis sobre los recursos hídricos del mundo, expusieron su preocupación y sus objetivos para 2050;

*“Over the past several decades, ever-growing demands for – and misuse of – water resources have increased the risks of pollution and severe water stress in many parts of the world. The frequency and intensity of local water crises have been increasing, with serious implications for public health, environmental sustainability, food and energy security, and economic development. (...) By 2050, humanity has achieved a water secure world, where every person has access to adequate quantities of water of an acceptable quality and from sustainable sources, to meet their basic needs and sustain their wellbeing and development. (...). Ecosystems are protected in a climate of peace and stability.”*

El agua es un recurso necesario para la vida, además de necesaria en muchos sectores como la pesca, la ganadería, la agricultura, la industria o el ocio. Garantizar el acceso a un agua “segura” es un derecho reconocido por la Organización de Naciones Unidas (ONU, 2010).

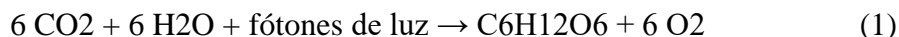
*Los productores primarios en los ecosistemas acuáticos.* Dentro de los ecosistemas acuáticos, el fitoplancton constituye la base de la cadena trófica, siendo los principales productores primarios (Simon, Cras, Foulon, & Lemée, 2009). El fitoplancton está constituido por el conjunto de los organismos acuáticos autótrofos del plancton. Se caracterizan por su actividad fotosintética y por vivir dispersos en los ambientes acuáticos (principalmente en la zona *fótica*, zona del agua en la que penetra la luz del sol). Consiste en un grupo polifilético de organismos que engloban; el reino Eubacteria (p. ej. cianobacterias), el reino Cromista (p.ej. los dinoflagelados,) y el reino Plantae (p. ej. clorofíceas)<sup>4</sup>. El fitoplancton produce en números brutos aproximadamente la mitad de la producción primaria del Planeta (Field, Behrenfeld, Randerson, & Falkowski, 1998). El fitoplancton determina la abundancia de los organismos acuáticos, dirigiendo el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos y especialmente en el bioma marino, determinando los límites máximos del rendimiento pesquero (Chassot, Bonhommeau, Dulvy, & Mélin, 2010). Evolutivamente, la capacidad del fitoplancton para llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica parece haber evolucionado una única vez en bacterias y posteriormente, se propagó mediante endosimbiosis a diferentes clados (Delwiche, 1999; Stiller & Hall, 1997), siendo un cambio evolutivo importante (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002). Los organismos foto-autótrofos oxigénicos que dieron lugar a las cianobacterias actuales, en unos cuantos cientos de millones de años, se propagaron a lo largo de la superficie del planeta bañada por el sol, haciendo posible la oxidación de los océanos y la formación de la atmósfera que conocemos por medio de GO, hace alrededor de 2.400 Ma (Holland 2006). Posteriormente, los eucariotas fotosintéticos evolucionaron hace más de 1.500 millones de años en los océanos del Proterozoico. Sin embargo no fue hasta la era Mesozoica (hace 251-65 Ma) que los principales grupos presentes hoy en los mares actuales adquirieron prominencia (Falkowski et al. 2004).

---

<sup>4</sup> Siguiendo la taxonomía más reciente propuesta por el Sistema del Catálogo de la Vida (*Catalogue of Life*) que presenta una clasificación en dos superreinos y siete reinos (“Catalogue of Life,” 2017; Ruggiero et al., 2015).

### III.-Introducción

La importancia ecológica del fitoplancton radica en su capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica. La fotosíntesis sustenta la vida en el planeta. Por medio de la fotosíntesis el fitoplancton sintetiza materia orgánica a partir de energía lumínica y compuestos inorgánicos [ec. 1]. La energía lumínica fijada es la producción primaria neta menos la energía invertida en la respiración, siendo la fotosíntesis y la respiración imprescindibles para mantener el equilibrio en la tierra.



La fotosíntesis consta de dos fases: la fase lumínica o fotodependiente y la fase oscura, la cual no depende de la luz. Durante la fase lumínica, la energía lumínica (fótones de luz) es captada por los pigmentos fotosintéticos y transportada a la cadena de electrones, creándose un flujo de energía que se utilizará para la síntesis de moléculas biológicas que actúan como fuente de energía (ATP y NADPH). En la fase oscura, la energía química generada y contenida en el ATP y NADPH es utilizada para reducir el  $\text{CO}_2$ , junto con el agua, para sintetizar moléculas orgánicas. Por medio de la fotosíntesis, el fitoplancton produce aproximadamente la mitad del oxígeno atmosférico presente en la tierra, impulsando la “bomba biológica” que fija en torno a 100 millones de toneladas de  $\text{CO}_2$  al día (Falkowski and Raven 2013; Schiermeier 2010). Este carbono fijado en forma de materia orgánica queda disponible para ser consumido por otras especies, posicionando al fitoplancton como base de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos. Por ejemplo, el fitoplancton presente en los océanos representa un 0,2% del total de la biomasa fotosintéticamente activa (siendo 1 PgC) y son capaces de producir de manera neta aproximadamente 50 PgC (Falkowski, Barber, and Smetacek 1998). El fitoplancton es una fuente de biomasa de rápida renovación y que cualquier factor que afecte a la tasa de renovación, podría desequilibrar los procesos a nivel oceánico. Además, el fitoplancton es un componente indispensable dentro los ciclos biogeoquímicos de los elementos que actúan como nutrientes, como: el nitrógeno y el fósforo. Las cianobacterias son uno de los grupos taxonómicos capaces de fijar nitrógeno atmosférico en formas asimilables para otros organismos. Por otro lado, el fitoplancton es clave para el mantenimiento del clima y del equilibrio planetario, mediante el intercambio de gases que tiene lugar entre la atmósfera y el océano (Rost, Zondervan, & Wolf-Gladrow, 2008). Cabe destacar que son grandes responsables del balance del carbono en la tierra, contribuyendo en la “bomba biológica de carbono” que ayuda a mitigar el efecto invernadero mediante el transporte del carbono a aguas profundas o los sedimentos oceánicos (Pennington et al., 2006).

La abundancia del fitoplancton y su distribución está determinada por factores ambientales como: la temperatura, la irradiación, los nutrientes, el estado de la columna de agua u otros organismos, siendo la temperatura y la irradiación importantes en el control de las tasas de fotosíntesis. Debido a esto, la actividad fotosintética y las abundancias del fitoplancton se ven afectadas tanto por los cambios naturales, como por los derivados de la actividad antropogénica. Resulta importante entender el declive del fitoplancton, teniendo en cuenta que la contaminación del agua es uno de los principales precursores del mismo (Ramakrishnan et al., 2010). Como resultado de la actividad humana, la cantidad de fitoplancton presente en la tierra ha decrecido desde 1800 (Boyce, Lewis, & Worm, 2010b). Aparentemente, la proporción de biomasa microalgal ha decrecido hasta un 40% del total, y se estima que la tasa de descenso anual es de 1% de la media a nivel global (Boyce et al., 2010b). Behrenfeld et al. (2006) observaron reducciones significativas en la producción del fitoplancton generadas por la actividad humana. Por lo tanto, estos organismos son dependientes de las alteraciones acarreadas por el cambio climático (Forest, Tremblay, Gratton, & Martin, 2011), siendo de vital importancia comprender y mitigar los efectos de cambio global sobre este grupo de microorganismos.



### ➤ Los microorganismos como organismos modelos para el estudio de evolución.

La habitabilidad del planeta depende de complejos sistemas entrelazados biogeoquímicos y climáticos, en los cuales los microorganismos juegan un papel fundamental en su mantenimiento y evolución. Ciertamente, no podrían entenderse los sistemas actuales de la Tierra sin la presencia de microorganismos sobre el planeta. Este concepto de planeta como sistema global ha llevado a teorías como la “Hipótesis de Gaia”, que postula la Tierra y la biosfera como una entidad auto-regulada que se mantiene y fomenta a sí misma (Lovelock, 2000; Margulis, 1993). El estudio de estos organismos “invisibles”, tanto desde una perspectiva evolutiva como ecológica, presentan un interés intrínseco debido a su ubicuidad, su papel ecológico, sus antecedentes adaptativos y por su preponderancia a lo largo de la evolución.

Desde el desarrollo de la primeras bacterias arcaicas hace 3,5 Ma, la biosfera ha estado dominada por microorganismos, siendo estos, los “ganadores” ocultos de la “lucha por la vida” en el planeta (Kutschera, 2009). Los microorganismos constituyen la mayoría invisible dentro de la biosfera del planeta (Kluyver & van Niel, 1956; Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Además, juegan un papel fundamental debido a la infinidad de asociaciones que presentan y por su implicación en los procesos biogeoquímicos catalizando transformaciones únicas e indispensables para el mantenimiento y desarrollo de la vida (Gilbert et al., 2014). Los microorganismos son capaces de sobrevivir en los ambientes más hostiles donde es imposible la supervivencia de otras formas de vida, como es el caso de los extremófilos (Rothschild & Mancinelli, 2001), siendo considerados modelos para el estudio de la posibilidad de vida en otros planetas o la posibilidad de panspermia (Lage et al., 2012). Desde el punto de vista productivo, el ser humano se ha beneficiado de la utilización de los microorganismos desde la antigüedad: se han encontrado evidencias de la utilización de la fermentación llevada a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de pan que datan del 6000 a.C. (Legras, Merdinoglu, Cornuet, & Karst, 2007). En la actualidad, los microorganismos se utilizan de forma generalizada a nivel industrial, presentando un papel fundamental en los procesos de fermentación de la industria alimentaria (Giraffa, 2004; Parekh, Vinci, & Strobel, 2000), en procesos de biorremediación tanto por biodegradación como por bioacumulación (Ledin, 2000; Watanabe, 2001) y en procesos de extracción de materias primas, como la biolixiviación de metales (Bosecker, 1997), entre otros.

Sin embargo, los microbios fueron los grandes olvidados de la Síntesis Evolutiva Moderna (Huxley 1942; Mayr 1942; Simpson 1944; Dobzhansky 1937). Los “arquitectos” de la Síntesis Evolutiva Moderna ciertamente tenía unos conocimientos fundamentales sobre microbiología, pero no fueron conscientes de la importancia de los microbios para entender la evolución (Wolf 2012). Huxley justificaba su exclusión basándose en que “no poseían genes en el sentido de unidades discretas del material hereditario”, por tanto no estaban sujetos a las mismas normas de “herencia y evolución que los organismos multicelulares”<sup>5</sup> (Huxley, 1942). Sin embargo, los microorganismos han proporcionado algunos de los mejores apoyos experimentales y ha contribuido con nuevas perspectivas a la evolución en su conjunto (p.ej. la evolución puntuada (Gould and Eldredge 1972)).

---

<sup>5</sup> “Bacteria have their own evolutionary rules, (...) Their heredity constitution is not differentiated into specialized parts with different functions. They have no genes in the sense of accurate quantized portions of heredity substances (...), the processes of variation, heredity and evolution in bacteria are quite different from the corresponding processes in multicellular organisms” (Huxley 1942, pp. 126, 131-132)

### III.-Introducción

Los microorganismos pueden ser modelos biológicos donde se pueden encontrar procesos generales a las formas de vida y gracias a sus irrefutables ventajas, se han convertido en el principal medio para llevar a cabo estudios de evolución a nivel experimental. Entre otras características los microorganismos:

- Son fáciles de propagar.
- Tiempos de generación cortos, permitiendo llevar a cabo experimentos a lo largo de múltiples generaciones.
- Permiten su conservación en suspensión por medio de la congelación y posterior reactivado, posibilitando la comparación directa del fenotipo ancestral con su evolucionado.
- Muchos microbios se reproducen asexualmente o presentan ambas reproducciones (sexual y asexual), permitiendo tener poblaciones clónicas y el estudio de la recombinación génica en aquellos con reproducción sexual.
- Presentan poblaciones grandes en espacios reducidos, pudiendo mantener un elevado número de replicados.
- Resulta sencillo controlar las variables experimentales, permitiendo tener un mayor control del ambiente.
- Existe mucha información molecular y genómica sobre múltiples especies de microorganismos, en especial debido a que presentan genomas pequeños, permitiendo identificar con eficacia genes.

## ➤ Estudios evolutivos experimentales

La biología evolutiva se desarrolló tradicionalmente por medio de la observación natural, contemplando la dimensión temporal y utilizando enfoques inductivos (siguiendo aproximaciones típicas de las ciencias que estudian el pasado, las ciencias históricas). Durante siglos, las hipótesis evolutivas solo se han contrastado mediante estudios comparativos basados en la observación de los organismos contemporáneos y el análisis del registro fósil (Elena & Lenski, 2003), denominado “el método comparativo” (Theodore Garland, Bennett, & Rezende, 2005). Esto no quiere decir que aproximaciones empíricas no tuvieran lugar, involuntariamente el ser humano ha llevado a cabo probablemente los experimentos evolutivos más largos de la historia: la domesticación de animales y plantas. Hecho que no pasó desapercibido para Darwin<sup>6</sup>, haciendo referencia a la selección artificial como evidencia de que los mecanismos de selección pueden dar lugar a una evolución. No obstante, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se empezaron a abordar deliberadamente acercamientos hipotéticos para poner a prueba las teorías evolutivas.

La primera referencia acerca de un experimento evolutivo controlado data de finales de siglo diecinueve, fue realizado por un contemporáneo de Darwin, William Dallinger (Dallinger, 1878). Dallinger llevó a cabo un experimento con “formas diminutas de vida” expuestas a temperaturas crecientes, siendo el primer experimento evolutivo conocido en microbios. Dallinger interpretó los resultados del experimento como una evidencia a favor de la adaptación por selección natural de Darwin, sin embargo pese al interés del propio Darwin<sup>7</sup>, sus resultados no llegaron a trascender. Desde mediados del siglo XX, empezaron a surgir estudios que documentaban los cambios en las poblaciones microbianas, considerándose los equivalentes microbiológicos a los estudios experimentales de genética de poblaciones durante esa época, que utilizaban el “organismo favorito” en ese momento- *Drosophila*. El grueso de la literatura sobre evolución experimental se ha aumentado considerablemente, especialmente en estudios con microorganismos, llegando a considerarse actualmente una disciplina en si misma (Buckling, Craig Maclean, Brockhurst, & Colegrave, 2009).

La evolución experimental es el estudio de las poblaciones a lo largo de múltiples generaciones bajo condiciones definidas y reproducibles tanto en el laboratorio, como en la naturaleza (Bennett, 2003; Garland, 2003; Garland & Kelly, 2006; Swallow & Garland, 2005). El efecto de la evolución se puede medir mediante diferencias fenotípicas o parámetros cuantitativos, siendo la fitness, la eficacia biológica determinada por la capacidad de reproducirse y dejar descendencia fértil, el parámetro más utilizado. En contraste con los estudios de observación del mundo natural, la evolución experimental presenta una serie de ventajas a la hora de abordar estudios evolutivos. Sus fortalezas se basan en su carácter experimental, permitiendo estudiar la evolución a tiempo real y utilizando controles y replicados que permiten estudiar la diversidad de respuestas, contrastar hipótesis y llevar a cabo análisis estadísticos comparando grupos. Además, en

---

<sup>6</sup> Darwin dedico el primer capítulo de su libro “El origen de las especies”(Darwin, 1859b) a la “Variación bajo el estado doméstico”.

<sup>7</sup> Dallinger envió una carta 1878 a Darwin con los detalles del experimento y Darwin le contestó el dos de Julio de 1878 mostrando su interés: “*I did not know that you were attending to the mutation of the lower organisms under changed conditions of life; and your results, I have no doubt, will be extremely curious and valuable. The fact which you mention about their being adapted to certain temperatures, but becoming gradually accustomed to much higher ones, is very remarkable. It explains the existence of algae in hot springs*”, pp. 191 del artículo “*The president’s address*” (Dallinger, 1887)

### III.-Introducción

estos estudios podemos estudiar la composición y las condiciones de la población ancestral, y se pueden aislar y analizar uno o varios factores ambientales (a diferencia con el mundo natural donde es difícil identificar el factor ambiental responsable del cambio adaptativo). Los experimentos evolutivos, por su naturaleza, pueden producir tipos de organismos totalmente nuevos con rasgos que mejoran una función o la fitness global en un nuevo ambiente selectivo. Los organismos “mejorados” resultantes pueden ser analizados genética y funcionalmente (Bennett, 2003; Garland, 2003).

Dentro de la intencionadamente amplia definición de evolución experimental, se engloban varios experimentos que implican cambios evolutivos. Siguiendo el criterio de Garland y Rose (2009), por un lado, podemos agrupar los experimentos para estudiar respuestas a eventos que ocurren en la naturaleza de manera adventicia: sucesos naturales recurrentes (p. ej. adaptaciones a ambientes “nuevos” o cambios en las poblaciones tras sequías, fuegos, epidemias...), impacto de especies invasoras (Huey, Gilchrist, & Hendry, 2005; Lee, Remfert, & Chang, 2007), “adaptaciones a paisajes humanizados” (p. ej. el melanismo industrial en *Biston betularia* (Kettlewell, 1958)) o “introducciones en terreno” tanto de poblaciones como de alteraciones en el hábitat. Otra gama serían los experimentos evolutivos en laboratorio: “experimentos de evolución en laboratorio” (Lenski and Travisano 1994), experimentos de evolución adaptativa como la “selección natural de laboratorio” (en inglés: *Laboratory natural selection*) por medio de la alteración de condiciones ambientales, o experimentos de “eliminación o sacrificio selectivo” (en inglés: *Laboratory culling*) mediante la exposición a un nivel de estrés letal o subletal. En todos los experimentos anteriormente mencionados, la selección o el proceso evolutivo se imponen de manera general. Por último tendríamos los experimentos en los cuales el investigador específicamente selecciona un rasgo fenotípico particular o una combinación de rasgos, siendo los experimentos de “selección dirigida” o “selección artificial”.

Uno de los enfoques más utilizados en evolución experimental es el estudio de la evolución adaptativa, abordando las dinámicas de adaptación de los organismos a ambientes específicos. Muchos experimentos evolutivos buscan entender como las poblaciones se adaptan a unas condiciones ambientales determinadas, normalmente asociadas a un factor, como: la temperatura, nutrientes, contaminantes, etc. La adaptación por selección natural es un proceso que ocurre mediante la propagación y sustitución de genotipos que presentan un mayor rendimiento y eficacia reproductiva en un ambiente concreto. La selección natural actúa sobre la variación presente en las poblaciones. La diversidad genética es generada por medio de la recombinación genética y la mutación. Los experimentos evolutivos de adaptación a un ambiente concreto pueden valorar, entre otros: i) la relación de fenotipo de un carácter concreto y su fitness en un ambiente determinado, estudiando los cambios en las frecuencias alélicas, ii) la adaptación mediada por la plasticidad o la variabilidad genética natural presente en la población, o iii) la variabilidad generada por mutaciones arbitrarias, entre otras. Aunque la principal fuerza evolutiva es la selección, en el laboratorio también actúan las demás fuerzas evolutivas presentes en la naturaleza, dando lugar al cambio evolutivo. Por ejemplo, la deriva genética, fuerza regida por el azar y fuente de fijación de variación, mediante el estudio del cambio de las frecuencias alélicas en un determinado carácter dentro de una población, mediado por el azar e influenciado por el tamaño poblacional (Escobar-Páramo, Ghosh, & DiRuggiero, 2005; Flores-Moya, Costas, & López-Rodas, 2008).

La versatilidad de la evolución experimental como marco experimental se demuestra en su aplicabilidad para poner a prueba predicciones de teoría evolutiva y abordar incógnitas. Se ha utilizado para comprobar hipótesis evolutivas, abordar controversias o como “prueba de concepto” de una teoría. Un ejemplo concreto sería estudiar la

reproducción sexual como fuente de cambio que permite una adaptación más rápida de la población. Probar los beneficios del sexo por medio de los microorganismos sexuales facultativos (como levaduras o algunos géneros de microalgas), proporcionan una oportunidad única para determinar las condiciones en las cuales el sexo es una ventaja. Los beneficios del sexo ya fueron estudiados por Muller (1932), y estudios posteriores contribuyeron a respaldar de manera empírica. En poblaciones suficientemente grandes y bajo condiciones precarias, el sexo favorece una adaptación más rápida mediada por la recombinación genética que genera variabilidad (Goddard, Godfray, and Burt 2005; Keightley and Otto 2006). Otro ejemplo sería el estudio del origen de la multicelularidad y las limitaciones de esta transición evolutiva (Grosberg & Strathmann, 2007). La evolución experimental recientemente ha seleccionado organismos pluricelulares en el laboratorio, *snowflake yeast* (levadura en copo de nieve), a partir de organismos unicelulares (Ratcliff, Denison, Borrello, & Travisano, 2012). Los estudios de evolución experimental están dominados por ensayos para probar predicciones de teoría evolutiva, pero también se pueden llevar a cabo otros enfoques como los estudios ecológicos en comunidades de microorganismos. Conocer la ecología de los microorganismos por sí mismos resulta de interés debido a su ubicuidad y su papel fundamental en todos los ecosistemas. Siendo especialmente útiles para entender procesos relacionados con patologías, como sobre caracteres determinados como la virulencia o la resistencia a antibióticos (Björkman et al. 2000; Smith et al. 2006).

Además, dentro del paradigma actual de cambio global, cada vez hay una concienciación mayor acerca de la velocidad de los procesos evolutivos, pudiendo llegar a ser rápidos, suponiendo una amenaza para la conservación de las especies y los ecosistemas tal y como los conocemos. La evolución experimental puede contribuir al entendimiento de procesos de extinción local y rescate evolutivo (ER, *evolutionary rescue*) (Bell & Gonzalez, 2009). Los estudios evolución experimental pueden arrojar luz sobre los escenarios de respuesta biológica al cambio antropogénico (Kawecki et al., 2012), por ejemplo frente a los incrementos de temperatura (Huertas et al. 2011). Pero como cualquier metodología, hay que tener en cuenta sus limitaciones y deficiencias. El abordaje de controles y replicados resulta más adecuado para estudios en el laboratorio. Consecuentemente, la gran mayoría de los experimentos se han realizado en el laboratorio, pese a que se han llevado a cabo de manera satisfactoriamente algunos estudios evolutivos experimentales en poblaciones naturales (Reznick, Bryga, & Endler, 1990; Zbinden, Haag, & Ebert, 2008). Por lo tanto, los experimentos evolutivos en laboratorio carecen en muchos casos de realismo ecológico y se alejan de la complejidad presente en la naturaleza, dificultando la extrapolación. Así mismo, a pesar de que todos los organismos vivos pueden ser sometidos a evolución experimental y que ésta se ha llevado a cabo en un amplio rango de organismos (p. ej. bacterias, insectos, roedores,...), debido a los requerimientos de poblaciones grandes y tiempos de generación cortos, muchos taxones han sido ampliamente excluidos de ser sujetos de este tipo de estudios. La evolución experimental no pretende reproducir o predecir la evolución en la naturaleza, pero si aportar conocimientos sobre los procesos que tienen lugar. Su principal fortaleza es su potencialidad para probar teorías evolutivas e hipótesis (p. ej. sobre respuestas adaptativas), lo cual no es alcanzable por otros enfoques alternativos (Bennett & Lenski, 1999; Garland & Rose, 2009).



➤ **El Antropoceno; la problemática del cambio global.**

Desde hace 10.000 años con el final de la última glaciación, la tierra se ha caracterizado por mantener una climatología estable (Petit et al., 1999). El ser humano moderno se aventuraba fuera de las llanuras africanas hace más 200.000 años, pero no fue hasta la llegada del Holoceno cuando tuvo lugar el desarrollo la civilización humana. Esta estabilidad permitió el desarrollo de las actividades humanas desde el neolítico con el desarrollo de la agricultura y ganadería hasta las más recientes revoluciones industrial y tecnológica. No obstante, el equilibrio de esta época se ha visto perturbado por las actividades que han permitido nuestra expansión como especie. Desde el desarrollo de civilización humana, el hombre ha tenido un impacto significativo a nivel local, pero desde la revolución industrial el ser humano se ha convertido en una fuerza de cambio a nivel global a tener en cuenta (Steffen et al., 2011; Zalasiewicz, Williams, Haywood, & Ellis, 2011). La actividad humana ha supuesto un impacto de tamaño magnitud que nos encontramos ante un punto de inflexión en el cual el cambio de era está ganado *momentum*, considerándose que nos encontramos en una época geológica distinta; el llamado Antropoceno (Biermann et al., 2010; Lewis & Maslin, 2015; Rousell et al., 2016). Este concepto fue acuñado por primera vez por el Premio Nobel Crutzen basándose en el cambio que el planeta ha sufrido por acción directa del ser humano (Crutzen 2006; Crutzen and Stoermer 2000). Recientemente, una comisión perteneciente al ICS ha recomendado la incorporación del Antropoceno como nueva escala geológica temporal partiendo desde mediados del siglo XX<sup>8</sup>, sin embargo todavía no se ha establecido el cambio de época geológica formalmente. Muchos argumentos se han puesto sobre la mesa para defender esta postura, como que en menos de 150 años hemos agotado el 40% de las reservas conocidas de petróleo que tardaron cientos de Ma en generarse.

Resulta evidente que la actividad humana está introduciendo modificaciones a escala global alterando irremediamente el planeta, afectando tanto a la atmósfera, la hidrosfera, la biosfera y la litosfera. Las emisiones de gases con efecto invernadero están modificando la composición de la atmósfera, incrementando la temperatura y dañando la capa de ozono (Steffen et al., 2011); la hidrosfera está sufriendo una acidificación, eutrofización y modificaciones en la circulación oceánica, además de incrementando la altura del mar debido a la desaparición de los ecosistemas polares debido al deshielo (consecuencia del calentamiento global (Tyrrell, 2011)); la litosfera está sufriendo cambios en sus patrones de sedimentación y erosión, provocados por la actividad humana (actividad minera, agraria y ganadera) y favoreciendo la desertización (Wilkinson, 2005); la pérdida de diversidad de la biosfera por la contaminación y la destrucción de los ecosistemas (Kolbert, 2014). Los efectos del ser humano en los sistemas terrestres son múltiples, complejos e interactúan, presentando muchas veces patrones exponenciales y magnitudes de efecto significativo a nivel global. La magnitud de cambio a escala global inducida por la actividad humana no tiene precedentes en la historia.

Teniendo en cuenta que el hombre es una criatura terrestre, el interés se ha centrado especialmente en los cambios a nivel planetario que ocurren en tierra (p.ej. la deforestación o desertización) y a nivel atmosférico (p.ej. el cambio climático o la capa de ozono), no

---

<sup>8</sup> El panel de científicos perteneciente al ICS designado para evaluar si nos encontramos ante una nueva época geológica, ha resuelto que existen suficientes evidencias para recomendar la entrada en el Antropoceno. La línea que determina este cambio de época sería entorno al año 1950, la llamada Gran Aceleración, debido a los signos estratigráficos derivados de la actividad industrial, los elementos radiactivos derivados de los ensayos nucleares, el cambio climático y el depósito de materiales antropogénicos (Waters et al., 2016).

siendo así a nivel de la criosfera o de los océanos. Sin embargo, en términos de “custodia” a nivel planetario, la hidrosfera juega un papel más importante que la superficie terrestre o la atmósfera en el funcionamiento de los sistemas terrestres; modula las diferentes modalidades de clima, proporciona la humedad para la lluvia y acumula mayores cantidades de carbono que los ecosistemas terrestres y la atmósfera combinados, actuando como sumidero de CO<sub>2</sub>. Por lo tanto resolver la crisis del agua y preservar los ecosistemas acuáticos es uno de los diversos desafíos a los que se enfrenta la humanidad, siendo capital para la conservación del planeta y de la vida que alberga.

Considerando que se trata de un reto entender el impacto de la actividad humana sobre los ecosistemas y la capacidad de los mismos para asimilar los cambios impuestos, vamos a abordar en esta Tesis algunos de los cambios derivados de la actividad humana, concretamente desde el punto de los ecosistemas acuáticos:

- El incremento de la temperatura por las emisiones a la atmósfera de gases de efecto invernadero.
- La liberación de contaminantes derivados de la actividad humana a los ecosistemas
- Extracción de recursos energéticos: el problema concreto del Uranio.
- Eutrofización de las aguas dulces: problemática de los HABs.
- Destrucción de los ecosistemas: una crisis de biodiversidad.

### Incremento de la temperatura

Desde el comienzo de la revolución industrial en el siglo XVII, mediante la quema de combustibles fósiles, el hombre ha liberado a la atmósfera gases de efecto invernadero (p. ej. anhídrido carbónico, metano u óxido nitroso). Durante el sXX, esta liberación han causado un incremento de la temperatura superficial del aire aproximadamente en 0,74°C y, al mismo tiempo, dado lugar a un incremento de la temperatura superficial del mar (ITSM) de 0,67°C, siendo más acusado en los últimos 40 años (Houghton, Ding, Griggs, & Noguer, 2001; IPCC, 2007), como muestra la Figura 3.

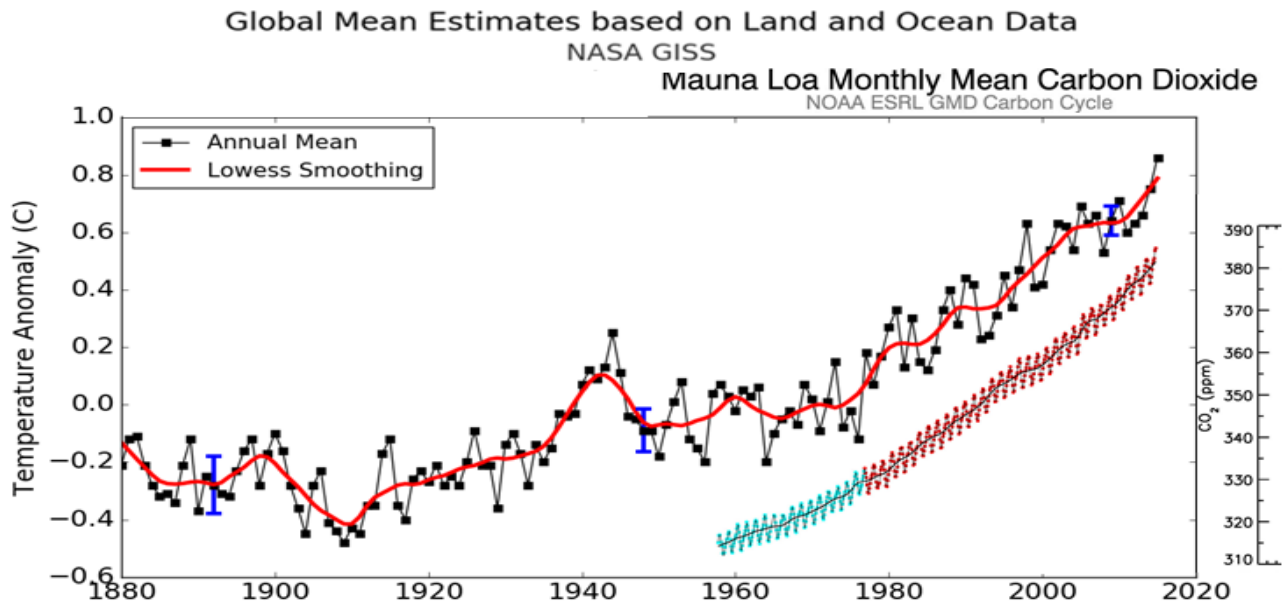


Figura 3. Figura combinada: drch. índice de la temperatura global media en tierra y los océanos desde 1880 hasta el presente. La línea sólida indica la media anual global de temperatura y la línea roja indica la agrupación simple cada 5 años. Las barras de error (con un límite del 95%) cuentan la incertidumbre de las medidas incompletas espacio-temporalmente. Drch. incremento del CO<sub>2</sub> en ppm desde 1958-2006: azul de 1958-1974, medidas tomadas por Scripps Institution of Oceanography, y rojo de 1974-2006, medidas tomadas por National Oceanic and Atmospheric Administration. Fuente; izq. NASA GISS (Hansen, Ruedy, Sato, & Lo, 2010) y drch. NOAA Earth System Research Lab. 2006.

Este incremento en la temperatura global ha derivado en aumentos en la temperatura a nivel acuático y terrestre. En este siglo, se esperan incrementos de la temperatura de la superficie del mar (ITSM) adicionales de en torno a 1,8°C en el mejor escenario, y de en torno a 4°C en los escenarios más desfavorables, según los modelos teóricos de predicción en función de los escenarios de emisión (IPCC, 2007)<sup>9</sup>. La tierra se encuentra en la actualidad en un *desequilibrio de radiación* en el cual se ingresa más energía en la atmósfera de la que disipa, la cual se almacena principalmente en los océanos incrementando la temperatura en los mismos (IPCC, 2013). En los ecosistemas terrestres el incremento de las temperaturas produce alteraciones en las estaciones, las floraciones, la puesta de huevos, las migraciones, etc. En el caso de los ecosistemas acuáticos, se han descrito migraciones, cambios en las abundancias, la distribución y la composición de las comunidades de organismos que habitan en los océanos, relacionado con el calentamiento global (Reuman & Holt, 2014; Scheffer, Carpenter, Foley, Folke, & Walker, 2001), siendo muy acusada la problemática del blanqueamiento de las barreras de coral a lo largo del globo (Hoegh-Guldberg, 1999).

<sup>9</sup> Según el IPCC 2007: para el escenario de bajas emisiones (B1), el rango más probable ITSM es de entre 1,1°C-2,9°C, y en el escenario más elevado (A1FI), entre 2,4°C-6,4°C.



### *Liberación de contaminantes a los ecosistemas.*

El incremento en la liberación de residuos al medio ambiente se ha visto propiciado por la explosión demográfica y la expansión en términos de industria y tecnología que ha tenido lugar durante el último siglo. La producción de químicos de origen antropogénico se ha visto incrementada de 1 a 400 millones de toneladas al año, en el periodo comprendido entre 1920 y 2000 (Gavrilescu, Demnerová, Aamand, Agathos, & Fava, 2015), llegando solo en Europa a 322 millones de toneladas (EUROSTAT, 2014). Las estadísticas publicadas por EUROSTAT revelan que aproximadamente el 90% de los químicos liberados son compuestos dañinos para todas las formas de vida del planeta (Figura 4). Las sustancias contaminantes liberadas representan una problemática debido a su concentración o liberación llegando a ser consideradas como tóxicos (Rai, Gaur, & Kumar, 1981).

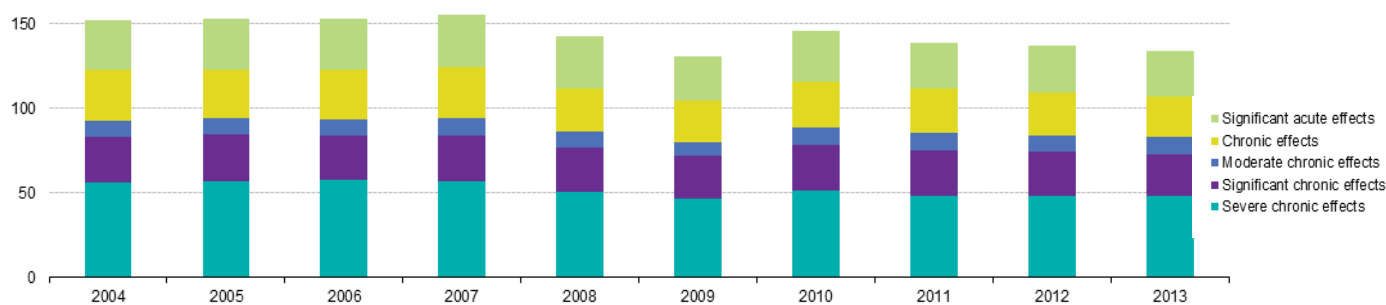


Figura 4. Debajo. Producción de químicos dañinos para el medio ambiente acuático desde 2004 al 2013 en millones de toneladas. Las estadísticas se basan en la Europa de los 28. Fuente: EUROSTAT 2014.

Las actividades humanas generan una gran cantidad de residuos y sustancias contaminantes que acaban siendo liberados a los ecosistemas acuáticos, convirtiéndose en un grave problema y una causa de estrés para los organismos acuáticos (Farré, Pérez, & Kantiani, 2008). Los principales contaminantes emergentes presentes en el medio acuático derivados de la actividad humana provienen de la industria (especialmente la textil e hidrocarburos), los núcleos urbanos (aceites, metales pesados y elementos traza; compuestos orgánicos; plásticos ... (Deblonde & Cossu-Leguille, 2011)), etc. La entrada de contaminantes emergentes en el medio acuático supone un nuevo reto para la especie. La capacidad de adaptación a estos estresores en función de la toxicidad, tipo de sustancia, la cronicidad y la concentración van a determinar la estructura de las comunidades futuras, derivando hacia aquellas capaces de resistir, eliminando las poblaciones o especies sensibles (Kasai & Hanazato, 1995). Por esa razón la toxicología evolutiva es necesaria para valorar los posibles escenarios de cambio global (Bickham, 2011; Pomati & Nizzetto, 2013), y asesorar en la evaluación del riesgo ambiental (*Environmental Risk Assessment*, ERA) (Bednarska, Jevtić, & Laskowski, 2013; Kramer et al., 2011). Entender las respuestas tanto genéticas como ecológicas de las poblaciones en escenarios de adaptación al cambio global, puede ser crítico para identificar si se pueden recuperar las poblaciones en declive o se extinguirán definitivamente.

En esta memoria hemos abordado experimentalmente el impacto de dos metales: el osmio y el berilio. Ambos metales elementos que se encuentran a bajas concentraciones en el medio ambiente (Chen, Sedwick, and Sharma 2009; Hans Wedepohl 1995; Armiento et al. 2013). Sin embargo, la actividad humana está alterando los ciclos químicos: en el caso del osmio, relacionado con uso de convertidos catalíticos por la industria del automóvil (Gagnon, Newkirk, & Hicks, 2006); y el berilio se utiliza en aleaciones con cobre y en la industria nuclear (Freeman, Freeman, & Stephen, 2015). Ambos se presentan como riesgo para la salud y medioambiental, debido a sus propiedades toxicológicas a dosis bajas (Batayneh, 2012; Luttrell & Giles, 2007) y al incremento de la presencia de estos metales en los ecosistemas.

### III.-Introducción

#### *Extracción de recursos energéticos: el problema concreto del uranio.*

La demanda global energética mundial no cesa de crecer impulsada por el incremento demográfico y por el crecimiento socioeconómico. Por lo que resulta evidente que los recursos energéticos minerales seguirán siendo extraídos generando una serie de residuos difíciles de tratar. Un ejemplo de este tipo de recursos es los residuos de minería de uranio<sup>10</sup>. El principal uso del uranio en la actualidad es como combustible para los reactores nucleares que generaron aproximadamente el 11% de la electricidad mundial y 25% en Europa (Nuclear Energy Institute, 2016), siendo la producción global durante 2015 de 60.496 toneladas de uranio (World Nuclear Association, 2016b) (Figura 5).

El uranio, en la naturaleza se encuentra en bajas concentraciones (ppm), en agua, rocas, tierra y seres vivos. Sin embargo, el uranio es considerado uno de los elementos más peligrosos debido a su toxicidad como metal pesado y por su radiactividad (Markich, 2002). Es un metal altamente tóxico incluso a dosis bajas para el riñón, cerebro, hígado, corazón y presenta efectos teratogénicos (Arfsten, Still, & Ritchie, 2001; Craft et al., 2004; Hindin, Brugge, & Panikkar, 2005). En el caso de la contaminación ambiental, su peligrosidad se debe a su alta solubilidad en agua y a su larga vida de desintegración, se considera un elemento altamente peligroso por su ecotoxicidad (Sheppard, Sheppard, Gallerand, & Sanipelli, 2005). Como resultado de la extracción de uranio por medio de lixiviación ácida, se generan charcas de evaporación que presentan varias características limitantes: condiciones extremas de acidez, metales pesados (en especial el uranio (U)) y radioactividad, entre otras. Estas charcas de minería resultan en ambientes extremos de origen antropogénico que presentan unas condiciones difíciles para la vida (Brito et al., 2013). Este tipo de ambientes extremos por acción humana existen en numerosas localizaciones debido a la demanda de uranio a nivel global. Los ambientes extremos de origen antropogénico, a diferencia de los presentes en la naturaleza *per se* (como desiertos o geiseros (Rothschild & Mancinelli, 2001)), en general surgen a lo largo de escalas temporales más cortas. Esta particularidad hace de los ambientes extremos de origen antropogénico son interesantes sistemas para estudiar procesos biológicos y evolutivos derivados de la respuesta adaptativa rápida frente a intensas perturbaciones por lo tanto, sirven de “laboratorios” en la naturaleza.

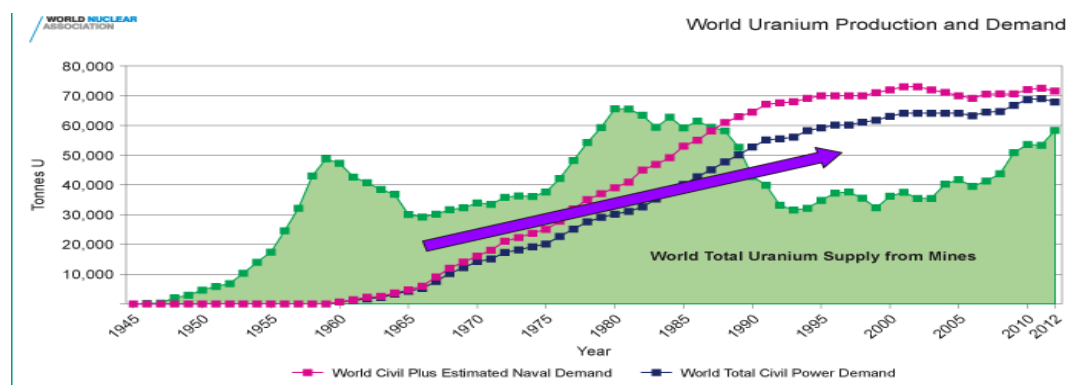


Figura 5. Producción y demanda a nivel mundial desde 1945 hasta 2012 en toneladas de uranio. Fuente: World Nuclear Association.

<sup>10</sup> El uranio (U) es un elemento químico metálico, y se trata del metal pesado con mayor peso atómico (masa atómica= 238) de los elementos que se encuentran en la naturaleza. En la naturaleza el uranio se presenta como mezcla de tres isótopos;  $^{238}\text{U}$  (99,284%),  $^{235}\text{U}$  (0,711%) y  $^{234}\text{U}$  (0,0085%), siendo el  $^{235}\text{U}$  el de interés industrial y militar. La relación de  $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$  es constante en la corteza terrestre, exceptuando raras excepciones como el yacimiento del Oklo, Gabón (Roth, 1977). El uranio presenta propiedades nucleares únicas, tratándose de un mineral radiactivo que decae lentamente presentando dilatados periodos desintegración y el isótopo  $^{235}\text{U}$  se caracteriza por ser el único isótopo fisil presente en la naturaleza.

### *Eutrofización de las aguas: problemática de los HABs*

La eutrofización es un fenómeno causado por un aporte excesivo de nutrientes al agua, principalmente nitrógeno y fósforo, que se ha acentuado derivado del incremento de la densidad de la población humana, la agricultura y la actividad industrial (Carpenter et al., 1998). Además, los fenómenos de cambio climático pueden alterar los ciclos de nutrientes en aguas tanto continentales como oceánicas debido a los cambios de temperatura de las aguas superficiales, la estratificación vertical o fenómenos acentuados de viento (Gregg, Sanford, & Winkel, 2003). Los procesos de eutrofización se han vinculado a un posible incremento de la incidencia, duración y extensión de los HABs, *Harmful Algae Blooms* (Ingrid. Chorus & Bartram, 1999; Hudnell, Dortch, & Zenick, 2008).

Los HABs o *Floraciones de Algas Nocivas*, es la denominación que se asignó a las floraciones o crecimientos masivos de organismos fotosintéticos unicelulares tanto en aguas continentales, como marinas, cuando llevan a cabo alteraciones drásticas en los ecosistemas. Se han descrito aproximadamente unas 500 especies implicadas en la producción de HABs (IOC-UNESCO, 2002)), siendo las cianobacterias las más comunes en las aguas continentales (Ingrid. Chorus & Bartram, 1999; Fleming et al., 2002). Un ejemplo de un HABs de una cianobacteria se muestra en la figura 6. Estos fenómenos ocurren sin que haya ninguna motivación o propósito humano, y han tenido lugar mucho antes de que la actividad humana comenzase a transformar los ecosistemas acuáticos (se cree que la primera referencia escrita data de 1000 años a. C.<sup>11</sup>). Pero en los últimas décadas, se ha sugerido una vinculación a procesos de eutrofización (D. M. Anderson, 1989), motivados por la acción humana, que ha modificado sustancialmente los ciclos de los nutrientes aumentando su movilidad y disponibilidad (Galloway & Cowling, 2002; Yan et al., 2016). El incremento de la incidencia y duración de los HABs supone un grave problema ambiental y de gran interés sanitario, especialmente cuando las especies producen toxinas o al hecho de que las grandes concentraciones celulares pueden dar lugar a episodios de anoxia. Por mencionar un ejemplo, debido a la toxicidad de la microcistina, una cianotoxina, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido 1 µg/L como límite superior de microcistina en agua de consumo (OMS, 2013). Por lo tanto resulta de especial interés estudiar la respuesta de estos organismos al cambio global, para poder hacer predicciones y mitigar el impacto de los HABs.



Figura 6 .Fotografías de un HABs de *Microcystis*: izq.: fotografía macroscópica, centro.: detalle del color de las muestras de agua y “natas” procedentes del bloom y, drch.: imagen a microscopio óptico de las células de *Microcystis* sp. Fuente: Elaboración propia.

---

<sup>11</sup> La Biblia (Exodo 7: 20-21) “y todas las aguas que había en el Nilo se convirtieron en sangre. Y los peces que había en el Nilo murieron y el río se corrompió...”

*Antropoceno: una crisis de biodiversidad.*

A lo largo de la historia, el *Homo sapiens* por su ecología ha sido señalado como un “superpredador global” sin precedentes, que regularmente se alimenta de otros depredadores alfa y tiene un impacto a escala global en las redes tróficas (Darimont, Fox, Bryan, & Reimchen, 2015). Este patrón de super-depredador se ha visto en los ecosistemas terrestres desde hace miles de años, por medio la caza intensiva por parte del hombre (p. ej. la pérdida parcial de la fauna terrestre entre el Pleistoceno/Holoceno (Doughty, Wolf, & Field, 2010)), pero en los últimos cien años se puede extender este patrón también a los ecosistemas acuáticos. Especialmente, desde la revolución industrial, la destrucción de hábitats para la agricultura y la ganadería, la deforestación, la caza, la sobre pesca, la contaminación, la liberación de gases de efecto invernadero, entre otras, son causa de un sobre-crecimiento de la población humana (Hooke & Martín-Duque, 2012; McKee, Sciulli, Fooce, & Waite, 2004; Vitousek, Mooney, Lubchenco, & Melillo, 1997).

Debido a la destrucción de los ecosistemas, actualmente nos encontramos ante una tasa de desaparición de las especies inusualmente rápida, la crisis biodiversidad contemporánea de nuestro planeta sugiere que nos encontramos ante un *Sexta Extinción Masiva*<sup>12</sup> (Leakey and Lewin 1996; Ceballos et al. 2015; Chapin et al. 2000). La tasa de extinción actual se ha estimado en aproximadamente entre 3000 y 30.000 especies al año, siendo 500 veces mayor que la tasa esperada (Woodruff, 2001), y en el caso de los vertebrados, la tasa sobre la extinción de fondo se ha incrementado entre 8 y 100 veces, con más de 617 especies catalogadas extintas en los últimos 500 años (Ceballos et al., 2015). Se trata de la tasa de extinción más rápida conocida (Simberloff, 1996). Aunque teniendo en cuenta que la mayoría de la biomasa del planeta es microbiana y representan un gran parte de la diversidad del planeta, es difícil estimar el efecto de una extinción sobre la biodiversidad total. Ninguna de los cinco eventos de extinción masiva datados presentan analogías directas con la pérdida de diversidad moderna actual<sup>13</sup>, debido a su velocidad y a que su principal agente se trata de un agente biológico, el *Homo sapiens* (si no tenemos en cuenta el GO). Este evento tiene un trasfondo puramente antropogénico: normalmente la extinción se atribuye a la incapacidad de los organismos para hacer frente a los cambios que ocurren en sus hábitats, pero actualmente la actividad humana está modificando los ecosistemas a una velocidad desmesurada, muy por encima de la capacidad de adaptación (Myers and Knoll 2001; Leakey and Lewin 1996). Esto convierte al ser humano en la principal fuerza evolutiva actual (Palumbi, 2001). Además, desconocemos el efecto de los efectos de la pérdida de biodiversidad a escala global, la biodiversidad debe de ser importante a la hora de mantener la “envoltura” ambiental del Antropoceno. Concretamente, a nivel de los ecosistemas acuáticos el efecto del cambio climático por medio del incremento de la temperatura y de la acidez (Schiermeier, 2010a), supone una grave amenaza para las especies acuáticas. Dentro de este escenario de pérdida de diversidad, la pérdida de diversidad en el fitoplancton puede tener efectos devastadores sobre los niveles tróficos superiores al ser el inicio de la cadena trófica del agua (por ejemplo, el blanqueamiento de los corales y la pérdida de los arrecifes (Hoegh-Guldberg, 1999)), y a nivel global.

---

<sup>12</sup> El término “La Sexta Extinción”, *The Sixth Extinction* en su terminología original en inglés, fue acuñado por primera vez por Richard E Leakey y Roger Lewin en su libro *The Sixth Extinction: Patterns of Life and the Future of Humankind*, para referirse a la pérdida de biodiversidad actual.

<sup>13</sup> Algunos autores han señalado que la Extinción del Cuaternario, pérdida parcial de la megafauna de herbívoros terrestres en torno al límite entre el Pleistoceno/Holoceno, presenta más similitudes (Erwin, 2008). La Extinción del Cuaternario se relaciona con cambios de temperatura derivados de los cambios, en la vegetación producidos por la caza de un nuevo predador, el hombre (Doughty et al., 2010; Gillespie, 2008; Grayson, 1984; Koch & Barnosky, 2006).



## ➤ El origen de la multicelularidad

La vida opera dentro de una continua carrera hacia su continuidad por medio de la adaptación, evolucionando formas innovadoras que han permitido la diversificación de los organismos vivos y la colonización de nuevos nichos ecológicos. A lo largo de la historia de la vida, han tenido lugar una serie de hitos que han constituido una coyuntura crítica, como son entender las dinámicas biológicas y la estructura de la vida (Maynard Smith & Szathmary, 1995). Por ejemplo, el origen de la célula eucariota o del sexo (Maynard Smith & Szathmary, 1995; West, Fisher, Gardner, & Kiers, 2015). Dentro de estas transiciones, la aparición de la multicelularidad supuso un punto de inflexión en la biología. Esta transición implica una importante fuente de novedades morfológicas y asociadas a sus funcionalidades. Principalmente, permitió la posterior aparición de individuos multicelulares complejos que presentan diferenciación celular, comunicación y transporte inter-celular. Hay que tener en cuenta que muchos requerimientos necesarios para la “organización multicelular”, como la muerte celular programada o la comunicación intercelular, probablemente ya existían en los ancestros unicelulares (revisado por (Kaiser 2001; Miller and Bassler 2001; Shapiro 1998; Bonner 1998).

Según algunos autores, la evolución de los organismos multicelulares a partir de unicelulares, ha tenido lugar de manera independiente en diferentes escenarios más de 20 veces (Bonner, 1998). Pese a que cada linaje presenta diferencias morfológicas, no está claro si comparten un ancestro común (Niklas, 2014) o es el resultado de una convergencia fenotípica (Burke, Liti, & Long, 2014). Múltiples hipótesis se han postulado para explicar el origen de la multicelularidad, como por ejemplo, como resultado de la interacción intercelular, de la cooperación y/o de la comunicación. En consecuencia, la evolución de la multicelularidad pudo representar la apertura de nuevas vías de adaptación no disponibles para los organismos unicelulares. La expansión de los posibles fenotipos multicelulares puede haber facilitado la adaptación mediante el incremento de la cantidad de variabilidad disponible. Aun así, la persistencia de las formas de vida unicelulares en todos los ambientes sugiere un coste asociado a la multicelularidad. Además, la evolución de los organismos multicelulares a partir de su ancestro unicelular debe haberse enfrentado a los conflictos genéticos en algún momento de su historia.

A diferencia de los organismos pluricelulares, los cuales no presentan diferenciación celular y pueden ser agrupaciones coloniales, los organismos multicelulares complejos han evolucionado únicamente seis veces y relativamente tarde según el registro fósil, en el Periodo Ediacárico (Knoll 2011). La aparición de organismos multicelulares complejos tuvo lugar mucho después de que los organismos unicelulares empezaran a diversificarse (hace más 3 mil Ma), y fue precedida por la aparición de los organismos multicelulares simples (Zhu et al. 2016; Schopf and Packer 1987). Los estudios recientes en paleontología (Zhu et al. 2016; Chen et al. 2014), comparativos (Kirk, 2005) y moleculares (Rokas, 2008) han elucidado algunas evidencias con respecto al origen de la multicelularidad. No obstante, el origen de la multicelularidad y las condiciones que permitieron dar el salto a unas formas de vida más compleja todavía no se conocen. Muchas preguntas importantes todavía no están resueltas. Por ejemplo, ¿existen realmente “herramientas” moleculares desconocidas responsables de la aparición de la multicelularidad?, ¿fueron los diferentes orígenes de la multicelularidad realmente independientes?, si lo fueron, ¿comparten las mismas fuerzas responsables genéticas o de comportamiento?, ¿son las transformaciones morfológicas el resultado de mutaciones, evolución adaptativa o dinámicas de cooperación?, entre otras preguntas.

### III.-Introducción

La transición hacia la multicelularidad supuso un punto de inflexión en la ecología de la tierra. Sin embargo, el estudio de este salto evolutivo resulta difícil por su lejanía en la evolución y por la posible pérdida de las formas intermedias desde el salto evolutivo hasta los organismos multicelulares actuales. El origen de la multicelularidad requiere de la evolución de mecanismos capaces de adquirir y mantener una diferenciación celular temporal y espacial, los cuales se han descrito en los múltiples posibles ancestros unicelulares. Por medio de estudios genómicos y comparativos (Miller and Technau 2010; Herron 2009; Herron et al. 2009), especialmente en microalgas, se han llevado a cabo una serie de estudios para esclarecer las trayectorias evolutivas y la persistencia en la naturaleza de los fenotipos unicelulares, sobre todo durante sus orígenes. Se han propuesto numerosos abordajes para explicar el origen de la multicelularidad: para evitar la depredación, en el caso de las microalgas (p.ej. la característica de formar colonias en *Chlorella vulgaris* (Boraas, Seale, & Boxhorn, 1998)), como respuesta a una dinámica cooperativa (Koschwanez et al., 2011), a partir de la formación de biofilms (Kragh et al., 2016; Muschick, Indermaur, & Salzburger, 2012) o como resultado de procesos mutacionales (como se ha visto en *S. cerevisiae* (Ratcliff, Fankhauser, Rogers, Greig, & Travisano, 2015)).

Estudios recientes han demostrado que es posible conseguir en el laboratorio organismos multicelulares a partir de ancestros unicelulares de *S. cerevisiae* por medio por selección por sedimentación (Ratcliff et al., 2012), y que el fenotipo multicelular resultante se debe a una única mutación que impide la separación completa de las células (Ratcliff et al., 2015). Por medio de este abordaje en laboratorio, podrían obtenerse modelos para el estudio del origen de la multicelularidad, investigando cuales son las limitaciones y las características que han permitido este salto evolutivo.

## ➤ Modelos evolutivos de comportamiento en poblaciones biológicas.

El estudio biológico de la evolución del comportamiento fue impulsado por E. O. Wilson, el cual popularizó el término de Sociobiología<sup>14</sup> (Wilson 1975). Por medio del estudio de las “bases biológicas del comportamiento” se pretende estudiar la evolución y las causas de los comportamientos en las poblaciones animales, mediante la aplicación del concepto de selección natural. Dejando aparte la controversia relacionada con la Sociobiología<sup>15</sup>, el estudio del comportamiento animal y la influencia de la evolución en el comportamiento han hecho importantes contribuciones al entendimiento de patrones de apareamiento, en insectos sociales como las abejas, o para comportamientos altruistas. En esta Tesis, hemos llevado a cabo una serie de trabajos mediante evolución experimental en combinación con modelos teóricos, abordando los comportamientos biológicos desde un punto de vista evolutivo. En los últimos años, la aplicación de diversos modelos ha permitido el análisis de fenómenos, como el altruismo, la coevolución o comportamientos sociobiológicos, y ha servido como “prueba de concepto” y como soporte a las hipótesis verbales (Servedio et al., 2014). Aquí proponemos dos abordajes diferentes para el estudio de algunas cuestiones evolutivas en conjunto con la evolución experimental: teoría de juegos evolutiva y economía evolutiva en biología.

### *Teoría de juegos evolutiva*

La teoría evolutiva de juegos (TJE), se trata de la aplicación de teoría de juegos a modelos de genética de poblaciones, es decir a poblaciones en evolución. TJE es una disciplina iniciada por Jonh Maynard Smith y George R. Price (Smith and Price 1973). Se trata de un modelo compresivo para el estudio de procesos evolutivos que engloba los procesos Darwinianos (el modelo de competencia -el juego-, la selección natural -la dinámica del replicador- y la genética -norma de herencia-), dentro del modelo matemático de teoría de juegos. Dentro de este esquema, la competencia puede ser analizada como “estrategias” y puede ser analizada con criterios matemáticos para predecir la prevalencias de las diferentes estrategias competitivas. Se trata de un abordaje útil para definir estrategias y regímenes de competición, basándose en equilibrios derivados del efecto de la frecuencia en la cual diferentes estrategias competitivas se encuentran en la población. Este enfoque concuerda con el método evolutivo, probar estrategias alternativas para incrementar las posibilidades de sobrevivir y reproducirse. En evolución, las estrategias son genéticamente heredables y controlan las acciones de los jugadores, siguiendo un proceso algorítmico. En TJE, los jugadores no necesitan actuar de manera racional, únicamente necesitan una estrategia, siendo el resultado del juego la prueba de cuanto de buena es dicha estrategia.

Un punto clave de la TJE es que el éxito de una estrategia no está determinado únicamente por cuan buena es, sino por su eficacia en presencia de otras estrategias alternativas, por la frecuencia en que otras estrategias son utilizadas dentro de la población y por competición consigo misma (en biología, una estrategia puede dominar la población y los individuos deben enfrentarse con otros individuos que llevan a cabo estrategias idénticas (Vincent & Brown, 2005)). En el juego evolutivo, el objetivo de los participantes es llegar a ser más apto que sus competidores, siendo capaz de reproducirse y dejar el mayor

---

<sup>14</sup> El término de Sociobiología fue acuñado por John Paul Scott en una conferencia en 1946 y se popularizó gracias E. O. Wilson's y su *Sociobiology: The New Synthesis* (1975). Wilson en la pp. 4 de su “*Sociobiology: The New Synthesis*”, definió Sociobiología como: “*Systematic study of the biological basis of all social behavior*”

<sup>15</sup> Relacionados principalmente con la extrapolación a comportamientos humanos y el determinismo biológico, siendo algunos de sus detractores Richard Lewontin (Lewontin, Rose, Rose, & Kamin, 1985) y Stephen Jay Gould (Gould 1996).

### III.-Introducción

número de descendientes posibles (siendo la recompensa en unidades de fitness). Se trata siempre de un juego de varios jugadores dentro de una población grande, en el cual las normas determinan como el más apto prospera (engendra más réplicas de sí mismo) y el menos apto va ser selectivamente eliminado de la población, siendo conocido como la dinámica del replicador (Samuelson, 2002). En esencia, la dinámica del replicador representa los mecanismos de heredabilidad, dejando aparte la mutación o recombinación. Con la intención de simplificar el juego, solo se tiene en cuenta la reproducción asexual y los jugadores no pueden elegir ni cambiar su estrategia, han nacido con ella y sus descendientes heredarán el mismo tipo de estrategia. El juego corre repetitivamente sin alcanzar unas condiciones finales, pero se estudian como resultados cambios en las dinámicas poblacionales, las estrategias del supervivencia o de éxito, y si se alcanza algún equilibrio. Cuando las dinámicas evolutivas alcanzan puntos fijos estables (atractores), se pueden equiparar a estrategias evolutivamente estables (EEE), similares a los equilibrios de Nash (Nash, 1950). Se considera una EEE a aquella en la cual una estrategia adoptada por toda la población puede sobrevivir frente a la invasión de otras estrategias mutantes (Maynard Smith, 1982). Dentro de la teoría de juegos, hay diferentes juegos que representan diferentes situaciones las cuales son objetos matemáticos de diferente carácter dependiendo del tipo de problemas con los que el organismo se tiene que enfrentar y las estrategias posibles que deberían adoptar si quieren sobrevivir y reproducirse.

En evolución, la TJE ha resultado valiosa a la hora de explicar procesos complejos en biología, particularmente para establecer las bases de comportamientos altruistas, selección por grupo, co-evolución, dinámicas ecológicas, etc. (Fletcher and Zwick 2007; Nowak and Sigmund 1998; Nowak and Sigmund 2005; Sachs et al. 2004). La TJE sirve como vehículo para el entendimiento de cuestiones fundamentales en biología entre las que se incluyen, selección por grupos, selección por sexos, altruismo, co-evolución, dinámicas ecológicas y relaciones de parentesco. Este tipo de aproximaciones han permitido explicar y generar modelos matemáticos en diversas áreas de ecología y evolución.

#### *La biología evolutiva como modelo en economía*

Los animales y los hombres comparten un legado de tendencias “económicas”, como: comportamientos cooperativos (Sachs et al., 2004), la devolución de favores (Trivers, 1971) o el resentimiento al engaño (West, Diggle, Buckling, Gardner, & Griffin, 2007). Algunas preferencias y criterios, han sido moldeados por la selección natural (Collins, Baer, & Weber, 2016). La economía y la biología evolutiva han estado interconectadas, ya Alfred Marshall (Marshall, 1920) reconoció la importancia de las ciencias naturales y la biología para el análisis económico<sup>16</sup>. Sin embargo, no ha sido hasta los últimos años, que los intercambios entre ambas disciplinas se han visto incrementados, impulsados en parte por los provocativos resultados en experimentos económicos con animales (p. ej. primates (Brosnan & de Waal, 2003; Hauser, Chen, Chen, & Chuang, 2003) y peces (Bshary & Noë, 2003)). La investigación conjunta de preguntas empíricas y teóricas es de mutuo interés para la biología y la economía, constituyendo el nacimiento de una colaboración interdisciplinar. Sin embargo, a diferencia con otras áreas (como la biología o psicología) con larga tradición en la utilización de animales como sujetos de investigación, en el área de la microeconomía nunca ha llegado a niveles similares de aceptación. El estudio del comportamiento animal y sus mecanismos neuronales desde un punto de vista evolutivo, permite identificar

---

<sup>16</sup> Marshall (1920) escribió en su “*Principles of Economics*” en el Apéndice C “The Scope and Method of Economics”, pg. 772, a nivel del margen: “*But economics has no near kinship with any physical science. It is a branch of biology broadly interpreted*”.



denominadores comunes y entender las fuerzas evolutivas que han dado forma a nuestros mecanismos de decisión.

Los principio o dinámicas comunes a múltiples seres vivos tienen una probabilidad mayor de ser establecer principios generales, siendo los animales un medio para probar principios económicos en microeconomía (Kagel, Battalio, & Green, 1995)<sup>17</sup>. A pesar de las diferencias cruciales, existen grandes similitudes en las asunciones e implicaciones en teoría económica y los modelos ecológicos de alimentación animal en la literatura biológica (Kacelnik, 2006; Kalenscher & van Wingerden, 2011; Stephens & Krebs, 1986). La capacidad de decisión de los animales se ha estudiado tradicionalmente asumiendo que los animales optimizan su ingesta de energía y sus oportunidades reproductivas bajo presión evolutiva, y adaptan su comportamiento en consecuencia. Se centran en optimizar la elección de una conducta teniendo en cuenta que un recurso se devalúa en función del tiempo invertido en obtenerlo, considerando únicamente el promedio de los resultados en el ambiente, y por lo tanto ignoran la variabilidad de los resultados o el riesgo (Kalenscher & van Wingerden, 2011). La ecología del comportamiento asume que los animales que maximizan su fitness deberían usar estrategias que maximicen, a la larga, la energía neta obtenida por unidad de tiempo (Stephens & Krebs, 1986), y maximizan el ratio de energía ganada en situaciones donde pueden elegir (Kalenscher & van Wingerden, 2011).

La literatura en economía y ecología sobre el comportamiento del consumidor en humanos y animales no-humanos, presenta semejanzas remarcables en las afirmaciones y predicciones sobre la toma de decisiones tanto bajo amenaza, como a lo largo del tiempo, sugiriendo que pueden compartir raíces evolutivas. Los roedores de laboratorio se ajustan sorprendentemente bien a las predicciones de las leyes de la demanda, el precio, oferta laboral, teoría de decisión y elección inter-temporal (MacDonald, Kagel, & Battalio, 1991). Otro ejemplo se encuentra en la relación entre los peces limpiadores y sus clientes en los arrecifes de coral, donde se han demostrado empíricamente los principios económicos de competencias monopolísticas: compradores con pocas alternativas de recursos tendrán transacciones más desfavorables (peces locales) que aquellos clientes que pueden comparar precios (peces que se desplazan grandes distancias). Los clientes locales, a los cuales los desplazamientos son costosos, son limpiados peor que aquellos que se desplazan de manera habitual (Bshary & Noë, 2003). En el caso de los simios, se ha demostrado la reciprocidad en el intercambio de favores en Chimpancés (Waal, 1997), en el caso de Babuinos el valor del producto (mirar a los recién nacidos) se incrementa según decrece su disponibilidad (Henzi & Barrett, 2002) o los monos capuchinos que rechazan una paga injusta (Brosnan & de Waal, 2003). De esta manera, el estudio del abordaje que llevan a cabo animales a la hora de intercambiar recursos y servicios nos ayuda a entender cómo y porqué los comportamientos económicos humanos han evolucionado. Del mismo modo, nos permite identificar patrones de comportamiento económicos en animales y entender como determinados comportamientos han sido moldeados por el efecto de la selección natural.

---

<sup>17</sup> Kagel et al. (1995) indicó en su libro “*Economic choice theory: an experimental analysis of animal behavior*”, en la pg. 4: “*If these basic principles fail to account for the behavior of simple organisms, such as rats or pigeons, in simple choice situations [...], how can they be trusted in much more complex situations involving much more complex organisms, such as our worldwide economic systems with human actors?, [...] a theory that works well across species has a greater likelihood of being valid than one that works well with only one, or a limited set of, species.*”

### III.-Introducción

## IV.-OBJETIVOS

A continuación se detallan los objetivos propuestos para la realización de esta Tesis, constituidos por tres objetivos de investigación básica y un objetivo aplicado:

1.- Valorar la capacidad de adaptación diferencial, tanto fisiológica como genética, entre grupos taxonómicos y ecológicos fitoplanctónicos, a contaminantes antropogénicos y a los posibles escenarios calentamiento global. Estudiar la adaptación rápida del fitoplancton a contaminantes ambientales de origen antropogénico, concretamente a berilio, osmio, aguas de minería de uranio y al incremento de temperatura.

2.- Investigar el efecto de la complejidad ecológica dentro de una transición evolutiva importante: el origen de la multicelularidad por medio del *snowflake yeast*.

3.- Estudiar modelos de competencia de poblaciones en los ecosistemas acuáticos como medio para entender dinámicas evolutivas de comportamiento (modelos en cianobacterias y sardinas).

4.- Implementar soluciones biotecnológicas relacionadas con el fitoplancton: biodegradación de microcistina (compuestos naturales orgánicos) y captura de metales pesados (el ejemplo del uranio).



## IV.-OBJECTIVES

Below are the pursued objectives of this dissertation:

1.-Assess the different adaptation capacity of phytoplankters, both physiological and genetic, among taxonomic and ecological groups, to anthropogenic pollutants and plausible scenarios of global warming. Study the rapid adaptation of phytoplankton to environmental pollutants of anthropogenic origin, in particular: Beryllium, Osmium, residual waters from Uranium mining and temperature rise.

2.-Examine the influence of ecological complexity within an important evolutionary transition: the origin of multicellularity by means of the snowflake yeast.

3.-Study competition models of populations in aquatic ecosystems to address behavior evolutionary dynamics (models in cyanobacteria and sardines)

4.-Implement biotechnological solutions related with phytoplankton: microcystin biodegradation (natural organic compounds) and heavy metals uptake (uranium removal from freshwater).



## V. MATERIAL Y MÉTODOS

*Insanity: doing the same thing over and over  
again and expecting different results*  
Albert Einstein





## ➤ Organismos experimentales y condiciones de cultivo

Dentro de los organismos experimentales utilizados, podemos agrupar las diferentes especies de organismos por grupos taxonómicos<sup>18</sup>. Todos los organismos fitoplanctónicos presentes en esta Tesis, pertenecientes a seis phylum diferentes, se han seleccionado por su importancia a nivel ecológico, por su ubicuidad, por sus efectos nocivos para la salud pública y por su relevancia sobre los recursos pesqueros. Además para estudios concretos se utilizaron organismos experimentales de otros reinos como el reino Morena o el Fungi.

Previamente al inicio de los experimentos evolutivos planteados en este documento, todas las cepas utilizadas fueron re-clonadas a partir de una única célula. De esta manera aseguramos la mínima variabilidad genética inicial, así como la homogeneidad del cultivo y una reproducción asexual en el punto de partida. Todos los medios fueron preparados a partir de compuesto de la casa comercial Sigma®, Aldrich.

### a) FITOPLANKTON

#### Phylum Chlorophyta

-Clase Trebouxiophyceae; Orden Chlorellales; Familia Chlorellaceae;

*Dictyosphaerium chlorelloides* (Naumann) Komárek et Perman

-Clase Chlorophyceae;

Orden Chlamydomonales; Familia Chlamydomonadaceae

*Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard

Orden Sphaeropleales; Familia Scenedesmaceae

*Scenedesmus intermedius* Chodat

Orden Chlorodendrales; Familia Chlorodendraceae

*Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher

Los organismos de este phylum son eucariotas conocidos como “algas verdes”. En concreto las cuatro especies que hemos estudiado son unicelulares, fotosintéticos y presentan una distribución global dentro de los hábitats de agua dulce y marinos. Juegan un papel fundamental como productores primarios y son responsables de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas de agua dulce a escala global. Son organismos modelo ampliamente conocidos, estudiados en numerosos trabajos de toxicología y ecología, especialmente *Chlamydomonas reinhardtii* por presentar reproducción sexual y debido a su movilidad mediada por flagelos. Evolutivamente las algas verdes dieron origen a las plantas terrestres, dando lugar a uno de los acontecimientos claves de la historia de la vida, e iniciando la evolución del conjunto del ecosistema terrestre (Bower, 1908; Stebbins & Hill, 1980). De entre las cuatro especies de este Phylum, *Tetraselmis suecica*, es la única especie marina estudiada dentro de las algas verdes. Se trata de un microalga unicelular y motil. Se caracteriza por crecer en altas concentraciones, presentar un alto contenido lipídico y no presentan toxicidad, por lo que es utilizada principalmente en acuicultura.

---

<sup>18</sup> Para la clasificación taxonómica de las especies fitoplanctónicas se empleó la base de datos internacional: AlgaeBase.org. En el caso de especies no fitoplanctónicas consultamos el Sistema Integrado de Información Taxonómica (en inglés ITIS, *Integrated Taxonomic Information System*): itis.gov

## Phylum Cyanobacteria

### -Clase Cyanophyceae:

#### Orden Chroococcales; Familia Microcystaceae

*Microcystis aeruginosa* (Kützinger) Lemmerman

#### Orden Synechococcales; Familia Prochloraceae

*Prochlorococcus marinus* Chisholm

Las cianobacterias, antiguamente llamadas algas verde-azuladas, es una división dentro del reino Eubacteria, en el cual se engloban los procariotas capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica. Presentan una distribución global, pudiéndose encontrar en todo tipo de ambientes; desde marinos hasta terrestres. Evolutivamente se estima que las cianobacterias llevan en nuestro planeta 3,5 Ma (Schopf and Packer 1987) y fueron los principales productores primarios de la biosfera, responsables por medio de la fotosíntesis oxigénica, de la atmósfera de oxígeno. En concreto, en los ambientes de agua dulce son características por sus proliferaciones en masa formando HABs, relacionados con la eutrofización y las altas temperaturas. Sus efectos nocivos se relacionan con anoxia y la producción de cianotoxinas. Siendo la especie más común en agua dulce *M. aeruginosa*, principal productora de microcistinas. Dentro de las cianotoxinas marinas, hemos estudiado la especie *P. marinus*. Se trata de una cianobacteria de pequeño tamaño, pertenece al picoplankton fotosintético, siendo probablemente el organismos fotosintético más abundantes del mar (Partensky, Hess, & Vault, 1999). *P. marinus* es responsable de una fracción significativa de la fotosíntesis en los océanos del planeta. Posee una particular combinación de pigmentos fotosintéticos. Se trata de una especie ubicua en océano abierto, siendo abundante en el rango 40°N al 40°S. Fue la primera bacteria marina secuenciada, se considera esencial para aportar nuevos conocimientos sobre el aparato fotosintético y sobre el ciclo global del carbono en la Tierra (Partensky et al., 1999; Whitfield, 2003).

## Phylum Miozoa (Superphylum Alveolata)

### -Clase Dinophyceae (Superclase Dinoflagellata)

#### Orden Prorocentrales; Familia Prorocentraceae

*Prorocentrum micans* (Ehrenberg)

*Prorocentrum triestinum* (Schiller)

#### Orden Gonyaulacales; Familia GoniDOMataceae

*Alexandrium minutum* (Halim)

#### Orden Peridiniales; Familia Thoracosphaeraceae

*Scrippsiella trochoidea* (Stein)

Están dentro de las pocas especies denominadas con el prefijo “dino” del griego “terriblemente grande o tremendo”, debido a que se encuentra dentro de los organismos unicelulares de mayor tamaño. Se trata de una Clase de eucariotas primitivos flagelados cosmopolitas de zonas costeras y neríticas. En el caso de *A. minutum* y *S. trochoidea*, presenta reproducción sexual y forman quistes de resistencia. Son capaces de formar blooms marinos denominados “mareas rojas” y pueden dar lugar a episodios de anoxia. Ambos *Prorocentrum* y *S. trochoidea* son considerados no tóxicos. *A. minutum* es altamente tóxico, presenta toxinas paralizantes (PSP, *paralytic shellfish poisoning*) (Halim, 1960).

## Phylum Bacillariophyta

-Clase Bacillariophyceae; Orden Bacillariales; Familia Bacillariaceae

*Nitzschia closterium* (Ehrenberg) Smith

-Clase Mediophyceae;

Orden Thalassiosirales; Familia Skeletonemataceae

*Skeletonema costatum* (Greville) Cleve

Orden Chaetocerotales; Familia Chaetocerotaceae

*Chaetoceros curvisetum* Cleve

Estas tres especies de este phylum se enmarcan dentro del grupo de las diatomeas marinas y presentan ambos tipos de reproducción, sexual y asexual. Las tres especies son organismos unicelulares pero *S. costatum* y *C. curvisetum* pueden permanecer unidas después de la división formando cadenas de varios individuos unicelulares. Presentan frústulo, una cubierta de sílice, con una amplia diversidad de formas en función de la especie. Son especies neríticas y cosmopolitas. Este grupo representa el 45% del total de producción primaria en los océanos (Mann 1999) y constituyen en gran medida la “bomba biológica” de captación de CO<sub>2</sub> atmosférico. Además, *N. closterium*, en concreto, forma blooms enormes, macroagregados llamados “nieve del mar”, importantes en el transporte vertical de materia en los ecosistemas marinos, y ha sido muy utilizada para evaluar la toxicidad de metales, y la bioacumulación de los mismos en ambientes marinos.

## Phylum Haptophyta.

-Clase Coccolithophyceae; Orden Isochrysidales;

Familia Noelaerhabdaceae

*Emiliania huxleyi* (Lohm.) Hay et Mohler

Familia Isochrysidaceae

*Isochrysis galbana* Parke

-Clase Coccolithophyceae; Orden Prymnesiales; Familia Prymnesiaceae

*Prymnesium polylepis* (Manton & Parke)

Todos los organismos pertenecientes a este Phylum son microalgas unicelulares marinas. Dentro de estas tres especies, *E. huxleyi* es un cocolitoforido unicelular marino capaz de producir placas de carbonato cálcico llamados “cocolitos” y son los mayores productores de calcita (Westbroek & Young, 1989). *E. huxleyi* presenta una gran plasticidad genética permitiéndole distribuirse por la mayoría de los océanos (excepto el Ártico y el Antártico (Paasche, 2001)), presentando un papel fundamental en el ciclo del carbono y como productor primario. Únicamente *E. huxleyi* y *P. polylepis*, de las casi 300 especies del cocolitoforidos son formadores de blooms (Jordan et al., 1994), presentando *P. polylepis* toxinas ictiotóxicas todavía no descritas (Gorokhova et al., 2014; Larsson et al., 2014). En el caso de *Isochrysis galbana* se caracteriza por ser ampliamente utilizada como alimento en acuicultura y como productor de fucoxantinas.

## Phylum Ochrophyta (Superphylum Heterokonta)

-Clase Raphidophyceae; Orden Raphidophyceae incertae sedis; Familia Raphidophyceae incertae sedis

*Olisthodiscus luteus* (Carter)

Son algas unicelulares marrón-doradas flageladas, con forma aplanada que contienen como pigmento principal fucoxantina y no presentan pared celular. Se trata de una especie bentónica, de la que se sabe poco sobre su distribución. Son productoras de mareas rojas.

El cultivo de fitoplancton en medio líquido se hizo en cajas de cultivo celular estériles (Greiner, Bio-one Inc, Longwood, NJ, USA), con tapón provisto de filtro que permite el intercambio gaseoso pero evita la contaminación de los mismos. Los medios sólidos se preparan en placas Petri estériles con Agar en polvo para microbiología. Los medios utilizados fueron: agua destilada enriquecida con caldo de cultivo *Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution*, para fitoplancton de agua dulce, y agua de mar enriquecida con medio *Guillards (F/2) Marine Enrichment Basal Salt Mixture*, para fitoplancton marino o costero. Las cepas fueron mantenidas a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  en cámaras de cultivo climatizadas y equipadas con fuente de luz emita por medio de tubos fluorescentes de luz blanca (Philips 30W/33), con un flujo de fotones de  $60\text{-}80\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  comprendida en el rango de luz visible de 400-700 nm. El ciclo de luz aplicado fue de luz continua 24h/24h. Todas las cepas se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial durante los experimentos mediante la transferencia de un pequeño inóculo celular a medio nuevo antes de alcanzar la etapa de saturación del cultivo. Las cepas se mantuvieron axénicas. Periódicamente se llevaron a cabo comprobaciones para asegurar la esterilidad del cultivo. La conservación por congelación de las cepas varió en función de la capacidad de congelación de las mismas

## b) OTROS MICROORGANISMOS

### **Reino Monera**

#### **Phylum Proteobacteria**

-Clase Gammaproteobacteria; Orden Enterobacteriales; Familia Enterobacteriaceae  
*Raoultella planticola* (Drancourt, Bollet, Carta, & Rousselier, 2001).

Bacteria Gram negativa, con forma de bacilo, no motil, aerobia y ubicua que se puede encontrar comúnmente tanto en el suelo, como en ambientes acuáticos. Se ha descrito en casos aislados como bacteria oportunista (Lam & Salit, 2014). Esta bacteria se vio envuelta en el debate de los organismos manipulados genéticamente (Holmes 1995; Fletcher 2001).

Cultivo en medios sólidos y líquidos, en placas Petri y en Erlenmeyer, respectivamente. Las condiciones de incubación fueron de 30°C, en oscuridad. Los medios utilizados fueron: agar bacteriológico (Bacto™ Agar), Agar R-2a y medio mínimo M9. La conservación se llevó a cabo mediante la congelación a -80°C en criotubos con un 25% v/v de glicerol.

### **Reino Fungi**

#### **Phylum Ascomycota**

-Clase Saccharomycetes; Orden Saccharomycetales; Familia Saccharomycetaceae  
*Saccharomyces cerevisiae*, Hansen 1993

Comúnmente conocida como la levadura de la cerveza, se trata de un hongo unicelular del tipo de las levaduras. Se trata del organismo modelo eucariota más estudiado. Presenta reproducción sexual y asexual, y su ciclo de vida presenta dos fases estables, una haploide y otra diploide. Su genoma ha sido completamente secuenciado (Goffeau et al., 1996) y está en constante revisión. Se ha utilizado en numerosos estudios de envejecimiento, meiosis, recombinación genética y reparación del ADN, funcionamiento de los genes, transducción de señales, metabolismo, apoptosis, etc., siendo el primer modelo de biología celular en eucariotas y pionera en los nuevos campos como la genómica funcional que estudia la interacción entre los genes y las proteínas (Botstein & Fink, 2011; Karathia, Vilaprinyo, Sorribas, & Alves, 2011). Un ejemplo, hasta el 30% de los genes implicado en enfermedades humanas presentan ortólogos en el proteoma de *Saccharomyces* (Foury, 1997), a parte de los genes del control de la división celular que son universales para todos los eucariotas (Nurse & Thuriaux, 1980).

Cultivo en medios sólidos y líquidos, en placas Petri y tubos de cristal 25 x 150 mm, respectivamente. Las condiciones de incubación fueron de 30°C en oscuridad y en agitación continua en el caso de los cultivos en medios líquidos. Los pases se llevaron a cabo cada 24 horas. Los cultivos sólidos se incubaron a la misma temperatura y se valoraban a las 48-72h. La conservación se llevó a cabo mediante la congelación a -80°C en criotubos con un 25% v/v de glicerol. Los medios utilizados fueron:

-Medio YPD:extracto de levaduras (10g), peptona (20g) y D-glucosa (20g) por litro, autoclavado a 121°C.

-Medio Mínimo para levaduras SD: base de Nitrógeno de levaduras (YNB) con aminoácidos (0,67g) y D-glucosa (0,5g) por litro, filtrado con Stericup de 0,22µm (Stericup-VP Filter Unit, Merk Milipore).

- Medio de esporulación: acetato potásico (10g), extracto de levaduras (1g), D-glucosa (0,5g) y un complemento de aminoácidos, por litro.

➤ **Técnicas de aislamiento e identificación de microorganismos.**

- Técnicas de aislamiento de cepas en muestras naturales

El aislamiento permite obtener cultivos monoespecíficos de uno o varios individuos (célula, quiste o filamento) de la misma especie. Los cultivos clonales referidos en este documento se obtuvieron a partir de un único individuo.

El aislamiento de cepas es un paso previo a la investigación básica en fitoplancton, especialmente para el estudio de muestras obtenidas a partir de ambientes naturales. El aislamiento puede llevarse a cabo de manera directa sobre muestras de agua o en casos en los que la especie se encuentre en baja concentración, concentrando la muestra mediante centrifugación o filtración. Las tres técnicas utilizadas para el aislamiento de microalgas en este documento fueron; siembra en estría en sólido, aislamiento con micropipeta y diluciones sucesivas. La idoneidad de cada técnica va a depender del tamaño, movilidad y morfología de la especie que se pretende aislar, siendo a veces necesaria la combinación de varias técnicas. Las técnicas de aislamiento se llevaron a cabo siguiendo los Procedimientos Normalizado de Trabajo (PNTs) del laboratorio. Las técnicas utilizadas fueron: aislamiento por diluciones sucesivas, por pipeteo capilar con micropipeta o rayado en estrías sobre placas de agar.

En el caso de las bacterias, el aislamiento se llevó a cabo mediante diluciones sucesivas en agua bi-distilada a partir de la muestra natural, y posterior siembra en placas de Agar. Posteriormente, se llevaron a cabo re-siembras hasta la obtención de colonias aisladas.

- Técnicas de identificación taxonómica

La identificación taxonómica del fitoplancton se llevó a cabo de manera cualitativa, mediante la observación directa de muestras naturales o de contenido estomacal, sobre las que no se ha realizado tratamiento o sobre muestras fijadas con un 4% v/v de formaldehído. El estudio taxonómico se llevó a cabo en soportes tipo cámaras de sedimentación y preparaciones cubre-porta, empleando microscopios ópticos (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany y Zeiss, Oberkochen, Germany) con epifluorescencia. Las microfotografías presentes en esta Tesis fueron obtenidas con una cámara acoplada (Axio Cam MRc, Zeiss). Las medidas taxonómicas se llevaron a cabo mediante análisis de imagen. Las microalgas fueron identificadas siguiendo las claves taxonómicas indicadas por la base de datos de algas (<http://www.algaebase.org>).

En el caso concreto de algunas cepas, se llevó a cabo la identificación a nivel de especie por medio de secuenciación molecular. Las cepas se centrifugaron a 9000x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y liofilización durante 5 horas, para la posterior extracción del material genético. La extracción consistió en la dilución en 100 µL de 0.05 M NaOH y calentamiento a 100°C durante 5 minutos, posterior re-suspensión en 900 µL agua y mantenido en un baño de hielo. Por último tras otra centrifugación, se recogió el sobrenadante (contiene las hebras de material genético) y se congeló a -20 °C hasta su uso. El Apéndice I recoge las técnicas, los primers y las secuencias obtenidas de las cepas concretas identificadas. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante BLAST (Zhang et al. 2004) y se compararon con las bases de datos GeneBank del NCBI, recogiendo: la extensión del fragmento acoplado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con el grado de identidad de secuencia.



## ➤ **Parámetros poblacionales de cepas microbianas**

La caracterización de las poblaciones se realizó por medio de la determinación de abundancias, la tasa de crecimiento, la fitness, el coeficiente de selección y/o por análisis de imagen. Para determinar estos factores se debe de partir de un inóculo celular conocido, el cual se va a propagar a lo largo del tiempo.

Las **abundancias** se pueden estimar de dos formas; mediante el cálculo del biovolumen de todas las especies presentes (abundancia x volumen) o mediante el conteo de las diferentes especies/células presentes en la muestra. El biovolumen puede calcularse mediante análisis de imagen, mediante estereología (metodología descrita más adelante), o a partir de la suma de las densidades de las especies presentes calculadas previamente. Los conteos celulares pueden realizarse manualmente de manera directa en microscopio, mediante contadores electrónicos de partículas tipo Coulter Counter o indirectamente por medio de la conteo de unidades formadoras de colonias (ufc). El conteo celular manual se llevó a cabo en cámaras de tipo Neubauer en un microscopio óptico a magnitudes 20x y 40x, tanto en muestras no fijadas, como en muestras conservadas a 4° C y oscuridad en formol tamponadas con Buffer Fosfato Salino (PBS, por sus siglas en inglés), para mantener la morfometría. La ventaja de este método es que te permite diferenciar especies y calcular las abundancias por especie en muestras de poblaciones multi-especie. Además, en microscopios con epifluorescencia, podemos valorar la viabilidad de las células mediante fluorescencia en muestras no fijadas. Mediante Coulter Counter (Z2™ Series, Beckman) se puede contar y dimensionar partículas, como las células, mediante el principio Coulter<sup>19</sup>. El conteo indirecto por medio de ufc, permite estimar, por medio de diluciones y siembra en placa, el contenido de células viables capaces de formar colonias en placas por mililitro o gramo, suponiendo que cada colonia se origina a partir de una única célula.

La **tasa de crecimiento (m)**, se define como el número de divisiones/día. Existen diferentes maneras de definir este valor, siendo una de las más precisas;

$$m = \text{Log}_e \left( \frac{N_t}{N_0} \right) \quad (\text{Crow \& Kimura, 1970}) \quad (2)$$

donde:  $N_t$  es el número de células/ml o ufc en el tiempo  $t$ .  $N_0$  es el número de células/ml o ufc en el tiempo 0.  $t$  es el número de días entre el tiempo  $t$  y el tiempo 0.

El valor se ve influenciado en función de los intervalos de tiempo seleccionados en relación al estadio de crecimiento del cultivo celular. En el caso de querer obtener la tasa de crecimiento exponencial debe valorarse a partir de las 48h (superada la fase *Lag* del ciclo de crecimiento del cultivo celular) y cada 24/48h hasta que el cultivo se aproxime a la saturación. Al final de la fase estacionaria, el cultivo empieza a decaer (muerte celular) y la determinación se puede dar por finalizada. De esta manera obtenemos la curva de crecimiento celular del cultivo y su tasa de crecimiento en diferentes puntos del ciclo.

La **fitness** o **eficacia biológica**, se define como la capacidad de un fenotipo o individuo para reproducirse y dejar descendencia, relacionando con su contribución de genes a la(s) siguiente(s) generación(es) (Michod, 2000). Los dos métodos más comunes

---

<sup>19</sup> Desarrollado por Wallace H. Coulter, patente de EE.UU # 2,656,508, se refiere a contar y dimensionar partículas en suspensión en un líquido conductor mediante el uso de un campo electrónico. Las partículas o células al pasar por un orificio o canal por el que circula corriente eléctrica, inducen un cambio en la impedancia a través del canal proporcional al volumen de la partícula.

para definir fitness son; fitness Malthusiana y la fitness Wrightiana. Si el tiempo es continuo si utilizamos la fitness Malthusiana y discreto en el caso de a fitness Wrightiana. Nosotros hemos utilizado la fitness Malthusiana ( $m$ ). Fitness Malthusiana ( $m$ ) se refiere a la tasa de crecimiento exponencial. Con un población de tamaño ( $N_t$ ) en el momento ( $t$ ), que implica  $N_t' = m N_t$ , y se calculan;

$$N_t = N_0 e^{mt} \quad (3)$$

donde  $N_t$  es el tamaño poblacional en el momento  $t$ ,  $N_0$  es el tamaño inicial de la población y  $t$  es el tiempo.

Así mismo, la fitness se puede expresar de manera absoluta o relativa. Fitness absoluta; se define como el ratio entre el número de individuos de un determinado genotipo/fenotipo después de una presión selectiva con respecto a genotipo/fenotipo antes de ser seleccionado. Fitness relativa; se cuantifica como la media de la progenie de un determinado genotipo/fenotipo comparada con la media de la progenie de los genotipos/fenotipos con los que se encuentra en competencia.

En el caso de querer comparar diferentes genotipos, se puede calcular la intensidad de selección contra un genotipo dado mediante el coeficiente de selección ( $s$ ), el cual mide la reducción proporcional de un genotipo con respecto a un estándar determinado por el genotipo más favorecido frente a las mismas condiciones. El coeficiente de selección se calcula de acuerdo a la ecuación:

$$s = 1 - \frac{m_d}{m_s} \quad (4)$$

siendo  $m_d$  la fitness del genotipo desfavorecido y  $m_s$  la fitness del genotipo favorecido, ambas calculadas bajo las mismas condiciones selectivas.

El **análisis de imagen** se encarga de estudiar la forma y las estructuras de los organismos o sistemas por medio de la morfología y la estereología, pudiendo llevar a cabo comparaciones. Los estudios se llevaron a cabo sobre imágenes tanto como sobre microfotografías de microscopio óptico como electrónico, por medio de estudios comparativos. La morfometría engloba el conjunto de técnicas que nos permite obtener las características dimensionales de un objeto: área, perímetro, altura y anchura. Además, permite caracterizar cuantitativamente el tamaño y las ultra-estructuras. Sin embargo, para obtener medidas tridimensionales debemos apoyarnos en la estereología (Costas et al. 1988; Costas et al. 1992). La estimación del área de los objetos se lleva a cabo mediante el método de rejilla de puntos y planimetría previamente descrita en detalle (Weibel & Bolender, 1973). Se basa en un punto de vista probabilístico por el cual la probabilidad de encontrar algo depende de la abundancia de dicho componente. La fiabilidad de la técnica radica en tener un número de cortes suficiente para reducir al máximo el error. El número de objetos, en nuestro caso microfotografías, puede estimarse mediante la técnica de medidas progresivas de Williams (Williams 1977), en nuestro caso hemos utilizado un límite de confianza del 5%. Del conjunto de parámetros morfométricos hemos evaluado;

El volumen absoluto ( $V_x$ );

$$V_x = V_{vx} \times N_{vx} \quad (5)$$

donde  $V_{vx}$  es el volumen relativo del componente  $x$  y  $N_{vx}$  es el valor de la densidad numérica del componente  $x$ .



$V_{vx}$  indica el volumen relativo del componente  $x$  con respecto al total del volumen celular. La densidad de volumen  $x$  se calcula a partir de la relación entre las áreas seccionales y el ratio de referencia siguiendo el principio de Delesse (Weibel & Bolender, 1973).  $N_{vx}$  es la densidad numérica relativa del componente  $x$  que indica el número de componentes de  $x$  por  $\mu\text{m}^3$ , y se calcula;

$$N_{vx} = \left( k N_a^{\frac{3}{2}} \right) (\beta V_{vx}) \quad (6)$$

donde  $N_a$  es el perfil de densidad numérica y,  $K$  y  $\beta$  son los coeficientes de forma los cuales estiman el diámetro de dispersión ( $K$ ) y la media de radio axial ( $\beta$ ) del perfil de la población. El coeficiente de forma  $\beta$  se calcula usando un normograma a partir de la determinación de la media del ratio axial (Weibel & Bolender, 1973). El diámetro de dispersión  $K$  se calcula dividiendo el diámetro medio de cada perfil elevado a  $3/2$ .

El coeficiente de forma de los diámetros del eje ( $C.F.d.$ ):

$$C.F.d = dD \quad (7)$$

donde  $d$  es el eje transversal y  $D$  el longitudinal.

El coeficiente de forma circular de la silueta ( $C.F.c$ ):

$$C.F.c = 4\pi \text{Área}(\text{Perímetro})^2 \quad (8)$$

Las microfotografías para el estudio de las ultra-estructuras fueron obtenidas por medio de microscopia electrónica de transmisión (MET). La MET permite visualizar de muestras ultrafinas, permitiendo visualizar estructuras y acúmulos intracelulares, aumentando hasta un millón de veces su tamaño. Las muestras para MET se obtuvieron de pellets celulares pequeños, lavados previamente tres veces con buffer fosfato salino a pH neutro y preservados en el fijador EM (buffer al 2.5% de glutaraldehído en cacodilato sódico-sacarosa y 4% de paraformaldehído, pH 7,4, a 4 °C durante 1-4 h). Posteriormente, las muestras fueron fijadas en un buffer a 1% de tetra óxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) durante una hora a 4°C, deshidratados en series crecientes de acetona (hasta 100% de acetona), y lavadas con óxido de propileno al 100% (reactivo intermedio, ya que la resina no es soluble en etanol). Por último, se hacen series oxido de propileno-resina de concentración creciente de resina y dejar reposar en resina 100% durante 12 horas. Las muestras embebidas en resina fueron cortadas en secciones de 80nm de grosor con un ultramicrotomo LKB 2088 y almacenadas en mallas de cobre.

El microscopio utilizado para fue un JEOL JEM-2010 (Jeol Ltd., Tokio, Japón). Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Las medidas se realizaron en las instalaciones y con el apoyo del Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de microscopía, de la Universidad Complutense de Madrid.

### ➤ Contaminantes

En el presente trabajo se han realizado estudios de toxicidad, adaptación y de biorremediación a una serie de estresantes y contaminantes.

- Contaminantes de naturaleza inorgánica

Se han utilizado diferentes tipos de metales pesados. En la tabla 1 aparece resumido, el nombre del metal, el compuesto químico, pureza, solubilidad y la procedencia:

*Tabla 1. Estresantes de naturaleza inorgánica.*

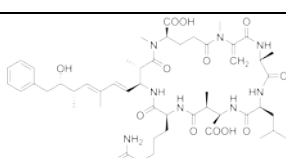
Nombre	Compuesto Químico	Pureza	Solubilidad en agua	Procedencia
Tetróxido de Osmio	OsO <sub>4</sub>	99,8%	60g/L	Sigma-Aldrich®
Sulfato de Berilio tetrahidratado	BeSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	98%	40 g/100 mL (20 °C)	Alfa Aesar®
Nitrato de Uranio hexahidratado	UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	98%	120/100 mL (20 °C)	Sigma-Aldrich®

Las determinaciones analíticas de metales disueltos se obtuvieron por Espectrometría Directa de Absorción Atómica en Horno de Grafito (EDAAG). En el caso concreto del uranio, la concentración total disuelta se determinó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS VARIAN RedTop), cuyo límite de detección es de 0.1 ng/mL. Las medidas de metales disueltos en agua fueron llevadas a cabo por los Centros de Apoyo a la Investigación (CAI), de la Universidad Complutense de Madrid.

- Contaminantes de naturaleza orgánica

Dentro de los estresantes de naturaleza orgánica de origen natural únicamente estudiamos la microcistina LR (tabla 3).

*Tabla 2. Estresantes de naturaleza orgánica.*

Producto comercial	Principio activo	Estructura química	Riqueza	Procedencia
Microcystin LR de <i>Microcystis aeruginosa</i>	Microcistina LR		≥95%	Sigma-Aldrich®

La determinación de toxinas en agua, concretamente de microcistinas, se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial de detección rápida MicroCystest (Zeu-Inmunotec, Zaragoza, Spain). Se trata de un procedimiento aprobado por la Agencia de Protección del Ambiente estadounidense (EPA). El funcionamiento del kit se basa en la detección de la concentración de microcistina asociado a la inhibición de las proteínas fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A) y un sustrato colorimétrico, capaz de detectar las posibles microcistinas tóxicas y presenta una buena sensibilidad (su límite de detección de 0.0039 ug/L). Las medidas se llevan a cabo según las indicaciones del fabricante (Smienk, Sevilla Mur, Peleato, Razquin, & Mata, 2007). Para medir la concentración de microcistinas en

agua se lleva a cabo sobre muestras filtradas con un filtro de 0,22 $\mu$ m. En el caso de la concentración de microcistina total de la muestra se lleva a cabo una sonicación por ultrasonidos (Vibrs Cell Modelo VC40 de Sonic and Materials Inc) durante 3 segundos en un Eppendorf en hielo, para romper la pared celular y liberar la toxina al medio. Los valores de absorbancia a 405nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiska FC, Thermo Scientific.

- Estresantes físicos

Se ha utilizado como estresante físico el incremento de la temperatura en grados Celsius. La regulación de la temperatura se llevó a cabo gracias al cultivo en condiciones controladas en cámaras de cultivo de microalgas.

- Contaminantes de origen minero: agua de minería de Uranio

Localización en el área de minería de Uranio de Saelices el Chico, Salamanca, y engloba las minas “Fe” y “D”, junto con la fábrica “Quercus” y “Elefante” (detalle geográfico mostrado en la figura 7). Actualmente, las diferentes áreas de minería se encuentran en restauración (World Nuclear Association, 2016) y se recogen aproximadamente unos 500.00 m<sup>3</sup> al año de los sectores contaminados (grandes vertederos a cielo abierto, antiguas pilas de lixiviación, antiguas minas a cielo abierto, etc.).

El agua necesita ser tratada por su acidez y contenido en metales, incluso después de las tareas de restauración (European Commission, 2012). Las muestras fueron proporcionadas por Javier Ruiz Sanchez, Empresa Nacional del Uranio (ENUSA), y previamente a su análisis fueron acidificadas con 2% HNO<sub>3</sub> y conservadas en oscuridad y a 4°C. Para la caracterización físico-química del agua se llevaron a cabo diferentes procedimientos. Las medidas de pH y conductividad se obtuvieron por medio un aparato portátil (Crison Instruments) midiendo directamente en las muestras de agua sin tratar. Los valores de dosis equivalentes de radiación se obtuvieron con un contador Geiger (Lamse, Mod. Eris1R, Madrid, España). La determinación de metales pesado se llevó a cabo según se indica previamente.



Figura 7. Vista aérea del área minera Saelices el Chico (magenta: terreno de ENUSA, verde: fábrica “Quercus”, rojo: instalaciones de la mina, azul: fábrica “Elefante”). Fuente Drch.: ENUSA, Izq.: Elaboración propia.

➤ **Diseños experimentales y metodologías.**

**1.- Estudios de la adaptación del fitoplancton; respuesta al Antropoceno.**

**1.1. Valoración del efecto de estresantes antropogénicos.**

**¿Cuál es el efecto de un agente estresante en función de su dosis?**

*“¿Qué existe que no pueda considerarse venenoso?*

*Todas las cosas son venenosas y nada carece de veneno.*

*Solamente la dosis determina la toxicidad de una sustancia”.*

Paracelso (1493-1541)

Relación dosis-efecto basada en la tasa de crecimiento

La relación dosis-efecto hace referencia a los cambios en un individuo o conjunto de individuos (efectos), consecuentes a la exposición a una cantidad de una sustancia activa (dosis). Por medio de la relación dosis-efecto podemos determinar los parámetros de inhibición y las concentraciones efectivas (CE), para llevar a cabo una evaluación de riesgo toxicológico. En nuestro caso, los estudios se llevaron a cabo según la guía 201 de la OECD para análisis toxicológico, siguiendo las indicaciones para determinar la inhibición del crecimiento en algas unicelulares debido a sustancias o mezclas presentes en agua (OECD 201, 1984, 2012).

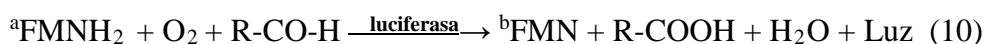
El propósito de este test consiste en determinar los efectos de una o varias sustancias sobre las tasas de crecimiento en algas unicelulares. Por medio de la exposición de algas en crecimiento exponencial a diferentes concentraciones de la sustancia de estudio a lo largo de periodos de tiempo de 72h (pudiendo ser más prolongados en función de la especie de estudio), para evaluar el efecto a lo largo de varias generaciones. La respuesta se evalúa en función de la concentración por medio de la comparación de las tasas de crecimiento de los cultivos expuestos y los controles no-expuestos. El crecimiento y la inhibición del crecimiento se cuantifican por medio de las abundancias celulares a lo largo del tiempo. Al final del test, la inhibición del crecimiento (calculada como % de Inhibición de la tasa de crecimiento) se pueden representar curvas dosis-efecto a lo largo del tiempo, y se puede determinar el % de inhibición de crecimiento (ec. 9) expresado como CE<sub>x</sub> (p. ej. 50% de inhibición; CE<sub>50</sub>). El porcentaje de inhibición se calcula:

$$\%Inh = \left( \frac{I_0 - I_f}{I_0} \right) \times 100 \quad (9)$$

donde  $I_0$  es el valor inicial de la medida y  $I_f$  es el valor obtenido tras el transcurso del tiempo de medida.

Ensayos Microtox®

El ensayo Microtox® se trata de una de las pruebas de toxicidad recomendadas por el EPA y en la norma ISO 11348-3, 1998 (bacterias liofilizadas). Se basa en la inhibición de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio Fischeri*, mediante un ensayo en lotes o por diluciones sucesivas, al ser expuesto a la muestra de estudio. La bioluminiscencia de *V. Fischeri* puede explicarse mediante la ecuación [ec. 10];



siendo  $^aFMNH_2$  el flavinmononucleótido hidrogenado, el  $^bFMN$  flavinmononucleótido deshidrogenado y la luciferasa la enzima catalizadora de a reacción.

Las sustancias tóxicas dan lugar a una disrupción respiratoria que reduce la emisión de luz, que es un sub-producto de la respiración. V. *Fischeri* ha demostrado ser sensible a una amplia variedad de sustancias (Wells, Lee, & Blaise, 1997). Para llevar a cabo los ensayos de toxicidad de Microtox® es necesario un luminómetro (Microtox® Model 500 Analyser, AZUR Environmental, Carlsbad, CA), para medir la luz emitida por las bacterias a una intensidad de 490 nm y mantiene una temperatura constante de 15°C. Materiales: cepas bacterias (*Vibrio fischeri* NRRL-B-11177) liofilizada y congelada (-18°C), solución patrón (dicromato potásico 0.08M), solución de reactivación de las bacterias (glucosa/cloruro sódico a pH 7.0) y soluciones salinas (NaCl al 7.5% y 2%). Las muestras con baja turbidez no necesitan un ajuste previo excepto por la salinidad. El efecto toxicológico se mide a tiempo inicial y tras 15 y 30 minutos. Obtenemos una curva de inhibición de la luminiscencia, relacionando la concentración/efecto en función del tiempo utilizando regresión lineal y procurando los valores de  $CE_{50}$ . La validez de los resultados, se calibra con un patrón de dicromato sódico, cuyo valor de  $CE_{50}$  es conocido.

#### Medidas de eficiencia fotosintética.

*“Watching fluorescence signals is like listening to the stethoscope by medical doctors.”*

Reto J. Strasser, 1995

Hemos evaluado la actividad fotosintética mediante estudios de fluorescencia de la clorofila (Chl), analizando la función del fotosistema II (FSII) durante el transporte de electrones por medio de fluorímetros de pulsos de amplitud modulada (PAM). El FSII presenta una alta sensibilidad a agentes estresantes, por lo que la contaminación antropogénica actúa influyendo globalmente la actividad fotosintética.

Lo fluorímetros que he utilizado para medir fotosíntesis fueron: Maxi-Imaging-PAM y ToxiPAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). Los fluorímetros tipo PAM, emiten pulsos de luz de amplitud conocida a una determinada longitud de onda (aprox. 470 nm, para producir la máxima excitación nivel de la Chl a) y son capaces de medir la fluorescencia reemitida en longitudes de onda larga (> 670 nm), por lo tanto son indicados para el estudio de algas verdes, no así en otros grupos (p. ej. cianobacterias, algas con Chl c o algas rojas (Büchel & Wilhelm, 1993)). Los fluorímetros tipo PAM miden la fluorescencia antes y después de la aplicación de un pulso de excitación conocido, en muestras pre-adaptadas a oscuridad ( $F_0$  (fluorescencia mínima) y  $F_m$  (fluorescencia máxima), respectivamente) o expuestas a la luz ( $F$ , fluorescencia basal y  $F'm$  máxima, respectivamente). La eficiencia fotosintética se calcula como eficiencia del FSII ( $Fm/Fv$ ), cuando las muestras se encuentran pre-adaptado a oscuridad:

$$Fm/Fv = \frac{(Fm-F_0)}{Fm} \quad (11)$$

El rendimiento cuántico del FSII ( $Y(II)$ ), cálculo de la proporción de energía absorbida para procesos fotoquímicos en relación al FSII:

$$Y(II) = \frac{(F'm-F)}{F'm} \quad (\text{Genty, Briantais, \& Baker, 1989}) \quad (12)$$



La inhibición fotosintética se calcula a partir de los valores de  $Y(II)$ , comparando los valores de un(os) control(es) con respecto a un(as) muestra(s) de estudio. El porcentaje de inhibición del  $Y(II)$  se calcula;

$$Inh. (\%) = \left[ \frac{(Y(II)_{control} - Y(II)_{muestra})}{Y(II)_{control}} \right] \times 100 \quad (13)$$

Otro coeficiente fotoquímico es el quenching fotoquímico ( $qP$ ): se refiere a la proporción de centros de reacción abiertos del FSII.

$$qP = (F'm - F)/(F'm - F'0) \quad (14)$$

Los procesos no fotoquímicos se relacionan con la disipación de calor, son indicadores de estrés muy sensibles para una detección temprana. Dentro de estos componentes del quenching no fotoquímico ( $NPQ$ ), el coeficiente de quenching no fotoquímico ( $qN$ ) es considerado el de mayor importancia.  $qN$  se relaciona con la disipación de calor mediante el ciclo de las xantofilas.

$$NPQ = \frac{(Fm - F'm)}{(F'm)} \quad (15)$$

$$qN = \frac{(Fm - F'm)}{(F'm - F'0)} \quad (16)$$

De los dos aparatos utilizados, el ImagingPAM analiza las áreas de estudio (áreas de interés previamente seleccionadas) de las imágenes de fluorescencia capturadas por una cámara sincronizada con la luz emitida (Ralph, Schreiber, Gademann, Köhl, & Larkum, 2005). En el caso del ToxiPAM solo permite hacer medidas en muestras de agua y compara ambos canales para detectar diferencias entre las muestras, la fluorescencia se mide mediante un detector fotomultiplicador. Para el cálculo de  $qP$  y  $qN$ , el  $F'0$  no puede ser calculado con los aparatos por lo que se tendría que estimar.

### 1.2. Capacidad de adaptación diferencial del fitoplancton al calentamiento global: aclimatación y variabilidad genética.

**El fitoplancton es un grupo polifilético, podemos valorar la capacidad de adaptación diferencial. ¿Qué nivel de presión selectiva puede tolerar una especie por medio de la aclimatación? ¿Cuál es la capacidad de adaptación mediada por la variabilidad genética?**

*A central goal of modern population biology is therefore to understand how stochastic environmental variation affects individual fitness and, in turn, population and evolutionary dynamics.*

(Reed, Waples, Schindler, Hard, & Kinnison, 2010)

Para determinar el tipo de adaptación de una población a un nivel de presión selectiva concreto, podemos valorar la tolerancia mediada por la aclimatación y la adaptación mediada por variabilidad genética presente. Para ello aislamos diferentes genotipos dentro de una misma población y los exponemos en un gradiente de presión selectiva de intensidad creciente, de manera simultánea. Se mide la afectación mediante la valoración de un carácter como la fitness. En función de la respuesta podemos determinar que, a una determinada intensidad de agente selectivo, la adaptación tuvo lugar por:

-Aclimatación: rango de presión selectiva en el cual todas las cepas (genotipos) de una misma especie presentan una respuesta similar.

-Adaptación mediada por la variabilidad genotípica: las diferentes cepas (genotipos) establecidos de una misma especie presentan una respuesta dispar entre ellos. Algunos genotipos presentan un nivel de adaptación mayor a las condiciones selectivas impuestas.

Para predecir el potencial de adaptación genético de un carácter frente a la selección podemos medir la variación heredable, pudiendo ser cuantificada en términos de heredabilidad ( $h^2$ ) o varianza genética aditiva (Falconer & Mackay, 1996). En sentido amplio, la  $h^2$  es la contribución relativa del factor genético en la variabilidad fenotípica existente en los diferentes caracteres y puede ser estimada mediante el componente de varianza. La heredabilidad ( $h^2$ ) es una característica de la población y en unas circunstancias ambientales, no es un carácter fijo. En sentido estricto se define como la varianza genética aditiva sobre la varianza fenotípica:

$$h^2 = \frac{s^2_a}{s^2_p} \quad (17)$$

Se puede estimar como el ratio entre la varianza genética ( $V_g$ ) y la varianza fenotípica ( $V_f$ ), esta última considerada como la suma de la  $V_g$  y la varianza residual ( $V_r$ ), que estima las diferencias debido a efectos no genéticos. Siendo:

$$h^2 = \frac{V_g}{V_f} = \frac{V_g}{V_g + V_r} \quad (18)$$

El ratio  $V_g/V_f$  fue estimado mediante análisis de varianza (ANOVA), estudiando la varianza entre clones y dentro de los replicados de los clones. La variación dentro del mismo clon estima la  $V_r$  y la varianza entre clones determina la  $V_r + V_g$ , para cada condición ambiental estudiada (López-Rodas et al. 2006). En nuestro caso el rasgo estudiado fue el componente de fitness a diferentes temperaturas. Los resultados de  $h^2$  pueden ser expresados entre 0 y 1, considerándose que;

$$\begin{aligned} 0 \leq h^2 < 0,25 & \text{ baja heredabilidad} \\ 0,25 \leq h^2 < 0,5 & \text{ heredabilidad media} \\ 0,5 \leq h^2 < 1 & \text{ alta heredabilidad} \end{aligned}$$

Si una población presenta una heredabilidad alta para un determinado carácter en un ambiente particular, indica que gran parte de la variabilidad observada se atribuye a factores genéticos y que la varianza fenotípica de ese carácter está poco influido por el ambiente en esas condiciones. En caso opuesto, la baja heredabilidad indica que la variación fenotípica se ve más influenciada por los factores ambientales. Además, caracteres cuantitativos bajo fuertes presiones selectivas, si presentan bajas heredabilidad se encuentran bajo fuerte acción de la selección natural (Falconer & Mackay, 1996). Por lo tanto, si un carácter presenta una alta heredabilidad, se puede hipotetizar que no está sujeto a una fuerte acción de la selección natural, sugiriendo un bajo valor adaptativo (Victoria López-Rodas et al., 2006). En relación a la selección o mejora, resulta interesante conocer la heredabilidad en sentido estricto puesto que permite predecir la respuesta la selección.

### *1.3. Experimento de Análisis de Fluctuación: adaptación al cambio ambiental brusco*

**¿El fitoplancton es capaz de adaptarse rápidamente a un cambio ambiental súbito?  
¿Cuál es el origen de la adaptación cuando la presión selectiva excede la plasticidad poblacional?**

El experimento de Análisis de Fluctuación es un experimento clásico, diseñado por Max Dëlbrück y Salvador Luria (1943) adaptado a medios líquidos (Lopez-Rodas et al., 2001). Estudia la adaptación a cambios bruscos en una corta escala temporal y la naturaleza de la mutación, combinando procedimientos experimentales y estadísticos. Establecemos una población ancestral clónica y seleccionamos una presión selectiva por encima de la  $CE_{99}$ , para asegurarnos una muerte masiva de las células sensibles. Posteriormente fundamos dos sets o grupos de experimentos (un diseño esquemático del Análisis de fluctuación se muestra en la figura 8):

**SET 1 (grupo de estudio):** Consta de en torno a 100 tubos (poblaciones independientes, con una variabilidad genética casi nula) en los que se inoculan  $10^2$  células en cada tubo (densidad suficientemente pequeño para lo reducir a prácticamente nula la probabilidad de tener mutantes), en un volumen determinado de medio de cultivo sin agente selectivo. Los tubos se incuban hasta alcanzar una concentración de  $10^5$  células por tubos. Una vez alcanzada esta cantidad celular se añade el agente selectivo a la concentración que se ha determinado. Al mismo tiempo que se funda el SET 2.

**-SET 2 (grupo control):** consta de aproximadamente la mitad de tubos presentes en el SET 1, en los que se inoculan directamente  $10^5$  células por tubo de la misma población ancestral utilizada en el SET 1. En este caso el medio de cultivo en el que se inoculan las células ya presenta el agente selectivo a la misma concentración a la que se ha expuesto el SET 1.

Ambos sets se propagan en condiciones controladas de laboratorio alrededor de dos meses y seguidamente, se determina la presencia o ausencia de células en los tubos. Posteriormente se realiza un conteo de cada una de las poblaciones y se lleva a cabo un

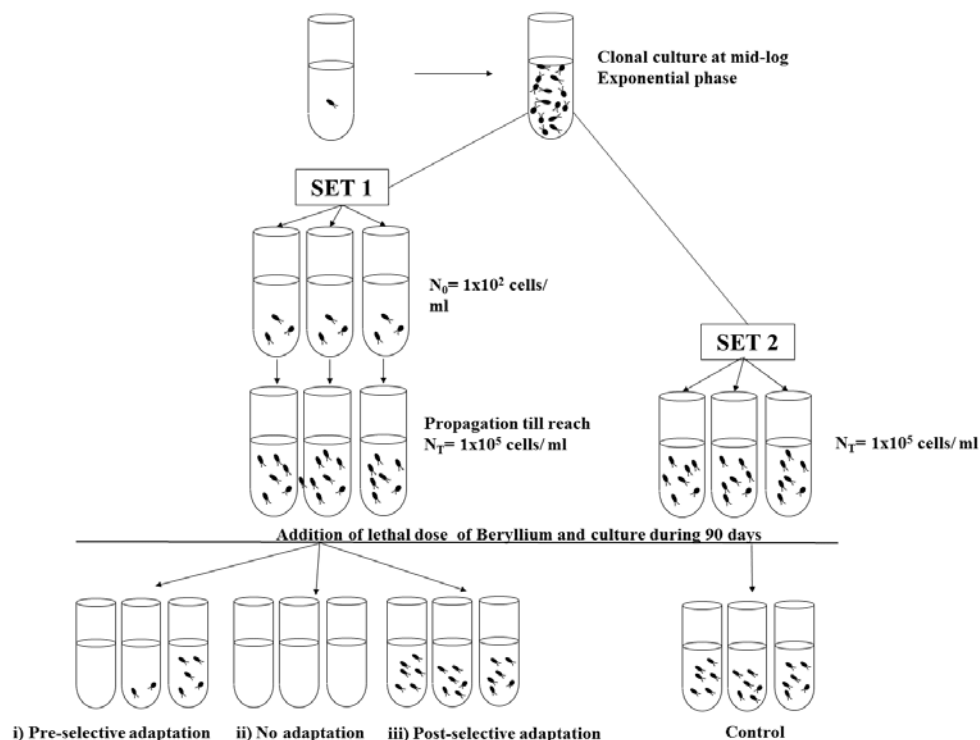


Figura 8. Representación esquemática del Análisis de Fluctuación. Dos sets diferentes de experimentos se establecen, SET 1 y SET 2, a partir de la misma población ancestral. El primero, SET 1, los cultivos son inoculados a  $t=0$ , y se dejan propagar hasta alcanzar una densidad de  $N_t$ . Cuando el SET 1 ha alcanzado la densidad  $N_t$ , se funda el SET 2 con una densidad de  $N_t$  células. Ambos sets se dejan propagar hasta el final del experimento. Tres posibles escenarios se pueden obtener en el Set 1: i) selección pre-adaptativa, ii) no adaptación o iii) selección post-adaptativa.



análisis estadístico para calcular la media y la varianza de cada SET. En función del crecimiento en los tubos del SET 1 y SET 2, existen tres posibles resultados:

- a) No adaptación: ninguno de tubos de ambos sets presenta crecimiento celular.
- b) Modelo pre-adaptativo: Si la varianza del Set 1/ Media del Set 1  $\gggg 1$ ; la varianza no sigue un modelo de Poisson y hay una gran diferencia entre SETs. Los replicados presentan diferentes concentraciones celulares, dependiendo de la generación celular en el que se haya dado la mutación. En el caso del set 2, se debe obtener el mismo número de mutantes por tubo: Varianza del Set 2/ Media del Set 2  $\approx 1$
- c) Modelo post-adaptativo: Si la varianza del Set 1/ Media del Set 1  $\approx 1$ ; la variación entre replicados sigue la ley de Poisson y no hay una diferencia significativa entre el SET 1 y el SET 2, en cuyo caso nos encontraremos ante el modelo post-adaptativo. En todos los tubos existe más o menos el mismo número de células resistentes ya que todas las células tienen la misma posibilidad de desarrollar resistencia.

El Análisis de fluctuación además nos permite calcular la tasa de mutación ( $\mu$ ), es decir la frecuencia con la que aparece una mutación espontánea que permite la adaptación al agente selectivo. Para ello se usa la siguiente fórmula:

$$P_0 = e - \mu(Nt - No) \quad (18)$$

donde  $P_0$  es la proporción de tubos del SET1 que no presentan crecimiento alguno,  $\mu$  es la tasa de mutación,  $No$  es la media del número inicial de células que ponemos en cada tubo del SET 1 y  $Nt$  es la media del número final de célula que tenemos por tubo en el SET1.

En el caso de mutaciones recurrentes, los nuevos mutantes surgirán en cada generación, los cuales presentarán una eficacia reducida en comparación con el genotipo no mutado en condiciones no selectivas (Spiers, 2014). Finalmente, un cierto número de mutantes estarán presentes en la población (a una frecuencia  $q$ ) y se mantendrá a lo largo del tiempo. La frecuencia ( $q$ ) de estos genotipos se puede calcular mediante la ecuación (Kimura & Maruyama, 1966):

$$q = \frac{\mu}{(\mu+s)} \quad (19)$$

siendo  $\mu$  la tasa de mutación y  $s$  el coeficiente de selección.

Este experimento se ha utilizado para estudiar la adaptación a: el incremento de temperatura, al osmio, al berilio y a ambientes extremos de minería de uranio.

#### 1.4. La reproducción sexual como mecanismo de adaptación rápida frente al estrés letal.

¿Es la reproducción sexual un mecanismo de evolución que permite la adaptación rápida al cambio ambiental brusco en poblaciones mal adaptadas?

*“Still, it is remarkable that the overwhelming majority of eukaryote species are at least sometimes sexual”*

(Bell, 1982; Turner, McBride, & Zeyl, 2009)

Las *Chlamydomonas* sp. son microalgas que pueden reproducirse tanto sexual como asexualmente. La reproducción asexual tiene lugar mediante fisión binaria dando lugar a organismos haploides, gametos. En el caso de *C. reinhardtii*, ambos gametos son iguales en

tamaño (isogamia) y no presentan pared. Cuando dos gametos de mating diferente (diferentes tipos o diferente cepa) se encuentran, se fusionan para formar un cigoto diploide (zigospora). El cigoto es capaz de producir una cubierta gruesa, que le permite permanecer latente bajo condiciones adversas. Tras un periodo de latencia, el cigoto se divide mediante meiosis, dando lugar a cuatro células haploides (Figura 9, representación esquemática y algunas fases del ciclo reproductivo de *C. reinhardtii*). Para inducir la reproducción sexual

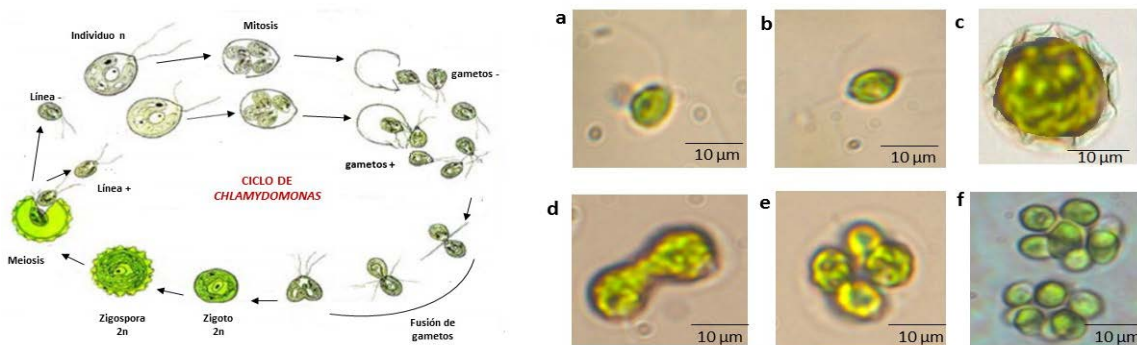


Figura 9. Drch. Representación esquemática y algunas fases del ciclo reproductivo de *C. reinhardtii*. Izq. Fotografías de microscopía óptica de algunas fases del ciclo; a) gameto isogénico, b) fusión de gametos, c) zigospora  $2n$ , d) división celular, e) y f) mitosis. Fuente: Elaboración propia.

en *C. reinhardtii* llevamos a cabo la unión en el mismo cultivo de cepas con mating diferente en fase de crecimiento exponencial y con elevada motilidad, en condiciones de cultivo de  $22^{\circ}\text{C}$  y luz constante en medio BG-11.

Para favorecer la recombinación, que tiene lugar principalmente en condiciones desfavorables, la unión de los matings se llevó a cabo en depleción nutricional en medio BG-11 diluido 1/5 v/v en agua destilada estéril y sin agitar. La conjugación de gametos puede observarse de manera directa mediante microscopio óptico. Una vez inducida la reproducción sexual realizamos un estudio comparativo de capacidad de adaptación, entre poblaciones clónicas propagadas asexualmente y poblaciones recombinadas mediante reproducción sexual. Para ello, fundamos dieciséis cultivos replicados por cada grupo de estudio (ChlaA, ChlaB y Chl A+B) en condiciones de cultivo de fitoplancton, con un pequeño inóculo y se propagaron hasta  $5 \times 10^5$  células por ml. Por medio de la propagación, nos aseguramos la presencia de alguna mutación ha tenido lugar en las poblaciones propagadas asexualmente y que ha habido un número elevado de cruzamientos en las poblaciones que presentan recombinación. Posteriormente se llevó a cabo la exposición al tóxico y se incubó durante 30 días. Tras la incubación se lleva a cabo valoraciones de viabilidad y de crecimiento.

## 2.- El efecto de la complejidad ecológica en el origen de la multicelularidad

### ¿Cuál es el efecto de la complejidad ecológica en el origen de la Multicelularidad? ¿Podemos evolucionar fenotipos multicelulares en ambientes con escasez de recursos?

Recientemente, por medio de evolución experimental Ratcliff et al. (2012) evolucionaron una levadura unicelular, *S. cerevisiae*, en un fenotipo multicelular al que denominaron *snowflake yeast* (levadura en copo de nieve). Tomando este experimento como referencia, vamos a estudiar la transición a la multicelularidad por medio de la selección por sedimentación y exponiéndolos a diferentes niveles ambientales. Por otro lado, vamos a valorar la estabilidad de los fenotipos multicelulares en diferentes niveles ambientales. Para responder a estas cuestiones, se han llevado a cabo dos experimentos diferentes:

**-Experimento de estabilidad de los fenotipos multicelulares:** partiendo de individuos multicelulares evolucionados *snowflake yeast* puros, exponemos los individuos multicelulares a diferentes niveles ambientales y de selección para valorar la posibilidad de reversión a la unicelularidad.

**-Experimento de evolución hacia la multicelularidad:** evolución de individuos unicelulares bajo diferentes niveles ambientales y de selección para valorar las limitaciones de esta transición, y en el caso de tener lugar el salto hacia la multicelularidad, valorar la diversidad resultante en función de las diferencias ecológicas.

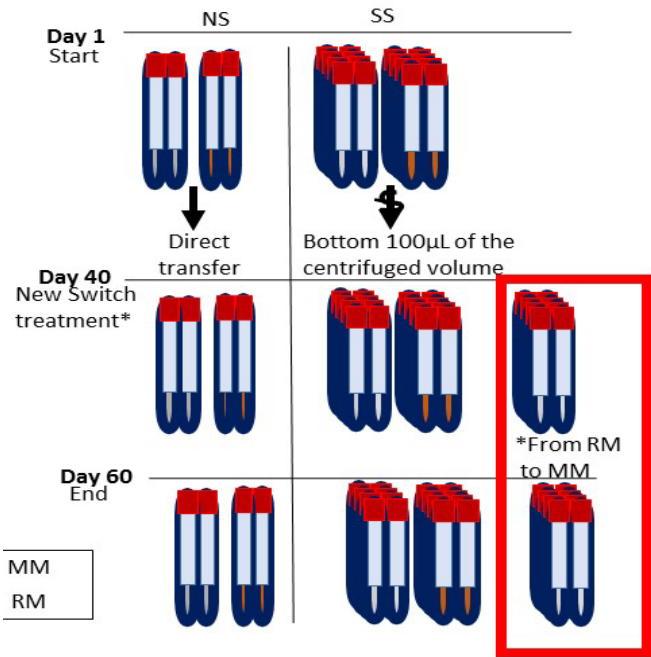
Los experimentos se realizaron a partir de poblaciones clónicas, para garantizar que no hay variabilidad genética inicial, siendo individuos multicelulares puros e individuos unicelulares puros respectivamente. Por cada experimento (representación esquemática figura 10), fundamos cuatro grupos o sets, con diferencias ambientales de selección:

- Set 1 (control positivo): medio rico (RM) y selección por sedimentación (SS).
- Set 2 (control negativo): RM y sin selección por sedimentación (NS).
- Set 3 (grupo de estudio): selecciona en medio mínimo (MM) y SS. Permite valorar si el salto a la multicelularidad está limitado por la restricción nutricional.
- Set 4 (grupo de estudio control): MM y NS.
- \*Set 5 (ambiente conmutado): únicamente en el experimento de evolución hacia la multicelularidad, si fenotipos multicelulares evolucionan en el Set 3. Inicialmente con MM y SS, y después transferido a RM y SS.

Los resultados iniciales esperados eran:

- Experimento de estabilidad de los fenotipos multicelulares: el mantenimiento de la multicelularidad en los sets: set1, set2 y set3, y algún tipo de reversión hacia fenotipos más pequeños o fenotipos unicelulares en el set4.

- Experimento de evolución hacia la multicelularidad: esperábamos no llegar a desarrollar la multicelularidad en los sets: set2, set3 y set4, puesto que consideramos que la restricción nutricional sería una limitación para esta transición. Et set1, que actúa como control positivo evolucionaría hacia la multicelularidad. El set5 pretende valorar si la restricción nutricional ralentiza la evolución hacia la multicelularidad.



	RM	MM	RM/MM*
SS	10	10	10
NS	5	5	-

\* Indica el número de replicados en el set cinco, replicados transferidos de RM a MM, en el experimento de origen de la multicelularidad.

Figura 10. Izq. Representación esquemática de los experimentos de selección gravitacional y complejidad ecológica en el origen de la multicelularidad. En rojo se enmarca el set 5, solo fundado en el experimento de evolución hacia la multicelularidad. Drch. Número de replicado por cada set y experimento.

Procedimiento experimental

Todos los replicados fueron crecidos en tubos de cristal de 25- x 150-mm con 10 ml de sus medios respectivos, a 30°C y en agitación a 250 x g. Los medios utilizados fueron: como RM, YPD, y como MM, medio mínimo. La SS varió en función del experimento siendo: por sedimentación en poyata en el caso del experimento de reversión y por medio de centrifugación en el caso del experimento de evolución hacia la multicelularidad. La transferencia de aquellos replicados NS se realizó transfiriendo 100 µl de cultivo crecido homogeneizado, a 10 ml de medio fresco cada 24h. El número de replicados por set, fue el mismo en todos los experimentos (Figura 10).

- Experimento de estabilidad de los fenotipos multicelulares: se fundaron dos experimentos idénticos con cuatro sets: set1, set2, set3 y set4, pariendo de dos cepas ancestrales multicelulares puros; snowflake yeasts C1W8.1 y C1W8.2. Cada 24h, los sets uno y tres fueron transferidos mediante sedimentación en la poyata durante 7 minutos, de un Eppendorf con 1 ml de cultivo crecido, cogiendo los 100 µL del fondo del Eppendorf y transfiriéndolos a tubos de cristal con medio nuevo. La transferencia de los sets 2 y 4, se llevó a cabo mediante la transferencia directa de 100 µL de cultivo homogeneizado a medio fresco, cada 24h. Los experimentos se llevaron a cabo durante 14 días.

- Experimento de evolución hacia la multicelularidad: se fundó un único experimento partiendo de una cepa ancestral unicelular, Y55, con 4 grupos iniciales: set1, set2, set3 y set 4. La selección gravitacional en set1 y set3 se llevó a cabo cada 24h tomado un ml de cultivo crecido y centrifugándolo a 100 x g durante 10 segundos. Los 100 µL del fondo del Eppendorf, fueron transferidos a medio fresco. La transferencia de los sets 2 y 4, se llevó a cabo mediante la transferencia directa de 100 µL de cultivo homogeneizado a medio fresco, cada 24h. El set cinco fue fundado en el día 40 de experimento, transfiriendo mediante SS, 100 µL de cada replicado del set1 a MM, y se propagaron en MM y SS hasta el final del experimento. El experimento se llevó a cabo a lo largo de 60 días.

### 3.- Modelos de competencia de poblaciones en un contexto evolutivo

#### 3.1. Un modelo para explicar la coexistencia de genotipos tóxicos y no tóxicos en *Microcystis* sp.

**¿Cómo evoluciona una población de *Microcystis* sp. con respecto a su toxicidad? ¿Por qué *Microcystis* sp. produce toxinas y cuál es el coste?**

*'I will jump into the river to save 2 brothers or 8 cousins'*

J.B.S. Haldane.

#### *Efecto de la deriva genética en la toxicidad de M. aeruginosa*

Analizamos el efecto de la deriva genética, un proceso estocástico (Klug & Cummings, 1999), en diferentes poblaciones de *Microcystis* sp para evaluar el efecto del tamaño de la población y los cuellos de botella en la producción de toxinas. Establecimos 21 cepas aisladas diferentes de *M. aeruginosa* cuya tasa de producción de toxina fue catalogada en tres niveles: no tóxica (valores de toxicidad inferiores a 0,25 ppbs de microcistina, fuera del rango de detección de Kit de medida), toxicidad media (en torno a 1,3 ppbs de microcistina) y toxicidad elevada (por encima de 1,3 ppbs de microcistina). Dentro de las 21 cepas seleccionadas, seis de ellas fueron consideradas no productoras. A partir de cada aislado hemos propagado dos poblaciones genéticamente idénticas inicialmente, establecido dos grupos: uno control, en el cual vamos a minimizar el efecto fundador y uno de estudio, en el cual vamos a intensificar el efecto fundador. Todas las poblaciones fueron fundadas con un inóculo inicial idéntico de  $10^5$  células y propagadas hasta  $10^8$  células bajo condiciones idénticas. Una vez alcanzada esta concentración celular, el grupo control fue transferido a medio fresco cada vez que alcanzó una población de aproximadamente  $10^8$  células por medio de inóculos de aproximadamente  $10^5$  células. En el caso del grupo de estudio, las transferencias se llevaron a cabo al alcanzar una densidad aproximada de  $10^8$  células por medio de un inóculo pequeño de aproximadamente 100 células. Excepto el número de células utilizado en cada transferencia, el resto de condiciones se mantuvieron constantes a lo largo del experimento. Ambos grupos se mantuvieron en cultivo activo por medio de transferencias periódicas, a lo largo de 20 transferencias.

#### *Abordaje teórico*

Las cianobacterias presentan una serie de genes para producir microcistinas (*myc*), los cuales no siempre están presentes en todos los genotipos. Dentro de los genotipos de *Microcystis*, intensamente estudiados, solo algunas cepas con genes *myc* han mostrado un producción negativa de microcistinas (Kaebernick, Rohrlack, Christoffersen, & Neilan, 2001; Mikalsen et al., 2003; Nishizawa, Asayama, Fujii, Harada, & Shirai, 1999; Tillett, Parker, & Neilan, 2001). Sin embargo las cianobacterias presentan una amplia variabilidad en los niveles de producción de cianotoxinas. Los genotipos productores y no productores pueden coexistir en un mismo bloom (Rainer Kurmayer, Christiansen, Fastner, & Borner, 2004; Vezie et al., 1997, 1998). Algunos estudios han concluido que dentro de las poblaciones naturales de cianobacterias, los genotipos con genes *myc* son más numerosos (Rantala et al., 2006), exceptuando en determinadas condiciones estacionales (Davis, Berry, Boyer, & Gobler, 2009). Se han propuesto diferentes funciones ecológicas para las microcistinas (Holland and Kinnear 2013), pero poco se sabe de los factores que influyen en las dinámicas de los genotipos tóxicos y no tóxicos dentro de un mismo HABs.

Mediante evidencias experimentales indirectas y basándonos en la literatura, proponemos una explicación teórica de la coexistencia de genotipos tóxicos y no-tóxicos



dentro de los blooms de cianobacterias mediante TJE. Teniendo en cuenta que en los blooms de HABs coexisten genotipos productores y no productores, los genotipos productores están llevando a cabo una estrategia altruista evitando de esta manera que los predadores se alimenten de las mismas. El altruismo tiene lugar cuando un individuo, pagando un coste (en nuestro caso fitness), expresa un beneficio para otro individuo o la población. El coste implica una desventaja en términos de supervivencia y reproducción. El altruismo supone una paradoja con respecto al éxito individual, que puede ser abordada con el juego del “Dilema del Prisionero”. Para ello proponemos un modelo de dos jugadores (productores -cooperadores- y no productores -tramposos-) y dos estrategias (producir o no producir), midiéndose las recompensas en términos de fitness, siendo la matriz de pagos;

	<i>m+ genotipo</i>	<i>m- genotipo</i>
<i>m+ genotipo</i>	$w1 (+)$	$w1 (-)$
<i>m- genotipo</i>	$w2 (+)$	$w2 (-)$

siendo *m+* y *m-* los genotipos productores y no productores respectivamente, y  $w1$  y  $w2$  son los resultados de las diferentes interacciones de la matriz.

Teniendo como punto de partida esta matriz de pagos, llevamos a cabo un abordaje de selección mediante parentesco, para encontrar una ruta hacia el altruismo y obtener una estrategia evolutivamente estable que permita la coexistencia de ambos genotipos. Para ello asumimos que la población es infinita y mediante experimentación, comprobamos que la fitness es menor en genotipos productivos. Asimismo, al ser organismos que se reproducen asexualmente determinamos que el nivel de parentesco es total. Por lo tanto realizamos un abordaje basado en el coeficiente de parentesco (*r*) (Hamilton, 1964), siguiendo un abordaje de fitness inclusiva.

### 3.2. Modelos de competencia en peces: los bienes Giffen desde una perspectiva evolutiva

¿Podemos explicar principios microeconómicos desde una perspectiva evolutiva?

¿Presentan los peces comportamientos análogos a decisiones económicas?

*The constraints of life force every organism to behave economically. The study of economic behavior is therefore not limited to “economics”.*

Ronald Nöe (2001)

*Abordaje experimental: evolución del consumo en función del mercado.*

Hemos estudiado el comportamiento a la hora de alimentarse de las sardinas (*Sardina pilchardus*) de la plataforma continental de Galicia y el Cantábrico. Por cada sardina capturada (de más de 20 cm de longitud) se ha extraído el contenido estomacal y en paralelo, se han tomado muestras del plancton presente en la columna de agua. Las muestras fueron preservadas en formaldehído al 4%, en oscuridad y a 4°C. En el laboratorio, el contenido estomacal y el plancton presente en la columna de agua fueron examinados mediante microscopía óptica. Las abundancias de zooplancton y fitoplancton se cuantificaron por estereología y se estimaron semi-cuantitativamente en 3 categorías (Margalef, 1955). Las abundancias se compararon mediante tests estadísticos de signos (Dixon & Mood, 1946). Las abundancias en la columna de agua y el contenido estomacal se compararon con un test de signos de dos colas. Para determinar si las abundancias son

significativamente mayores o menores con respecto a la columna de agua, realizamos un test de signos de una cola.

### Abordaje teórico

En nuestro modelo, asemejamos nuestros consumidores (las sardinas, *Sardina pilchardus*) son consumidores de subsistencias, y nuestro mercado, las abundancias relativas de alimento en la columna de agua, y nuestra riqueza es la energía. Agrupamos dos tipos de bienes: el fitoplancton (x) (diatomeas y dinoflagelados), normalmente más abundantes (por lo tanto más fácil de obtener), considerado el bien básico, y zooplancton (y) (copépodos y tintínidos), menos abundantes (por lo tanto más costosos de obtener), considerado el bien energético.

El modelo matemático se basa en la ecuación de Slutsky<sup>20</sup> utilizada para estudiar el efecto de la demanda. Relaciona la variabilidad del precio (la energía en nuestro caso), manteniendo las entradas o ingresos iniciales dando lugar a una nueva función de utilidad (Slutsky, 1915). Teniendo en cuenta que los bienes Giffen tienen una curva de demanda positiva, consideramos que los consumidores presentan un comportamiento Giffen, cuando el contenido de fitoplancton es considerablemente mayor y el zooplancton menor en el contenido estomacal comparado con las abundancias en la columna de agua.

En nuestro modelo el consumo de las sardinas está determinado por las características de los bienes de estudio; energía,  $e$ , y requerimientos (atribuido a la necesidad nutricional),  $r$ . Las presas se agrupan en dos categorías; bien básico (fitoplancton),  $x$ , y el bien energético (zooplancton),  $y$ , denotando el consumo de cada tipo de bien.  $(e_x, r_x)$  y  $(e_y, r_y)$  son las energías y requerimiento para cada bien respectivamente. Asumiendo que el consumo del bien energético se verá incrementado una vez que el nivel de subsistencia necesario aportado por el bien básico has sido alcanzado. Si  $(p_x)$  y  $(p_y)$  son el precio de los

<sup>20</sup> La ecuación de Slutsky de la elasticidad de la demanda se define:

$$\varphi = \varphi^h - b\varphi_r$$

donde  $\varphi$  es la elasticidad del precio de la demanda (efecto total),  $\varphi^h$  la elasticidad del precio compensada o demanda hicksiana, representa la elasticidad de la demanda debido a la variación del precio, excluyendo el efecto renta y manteniendo la función de utilidad constante (efecto de sustitución),  $b$  el presupuesto asociado a un bien y  $\varphi_r$  la elasticidad de los recursos (siendo  $b\varphi_r$  el efecto renta).

Efecto de sustitución (SE); es el efecto derivado de la varianza en el precio de un bien que conduce a un descenso de la demanda del mismo y un incremento de otro, cambia la tasa de intercambio. Siempre actúan en dirección opuesta al precio energético.

Efecto renta (IE); es el efecto derivado de la varianza en el potencial de adquisición, la renta real. Actúa en dirección opuesta al precio energético de los bienes comunes y en la misma dirección que el precio energético de los bienes inferiores.

Desarrollando la ecuación de Slutsky;

$$(\delta x / \delta p_1) = (\delta h_1 / \delta p_1) - x(\delta x / \delta I) = \text{Efecto directo (debido al cambio en el precio del bien } x)$$

$$(\delta y / \delta p_2) = (\delta h_2 / \delta p_2) - y(\delta y / \delta I) = \text{Efecto cruze (debido al cambio en el precio del bien } y)$$

donde  $x$  (representa la demanda del bien básico);  $y$  (representa la demanda del bien rico);  $p_1$  (precio de  $x$ );  $p_2$  (precio de  $y$ );  $h_1$  (demanda hicksiana de  $x$ );  $h_2$  (demanda hicksiana de  $y$ );  $I$  (renta =  $p_1x_1 + p_2x_2$ ).

El tipo de bien condiciona la variación en la demanda. Solo un incremento en el precio suficiente para compensar el efecto de sustitución y producir un efecto negativo en los recursos, da lugar a un comportamiento Giffen de la demanda ( $SE \leq 0$  y  $IE > 0$  ( $b\varphi_r > \varphi^h$ );  $\varphi > 0$ )

bienes (en nuestro caso el precio representa la abundancia de las presas en función de la energía invertida en la alimentación):

- mucha abundancia, menor precio energético por lo tanto menor precio.
- baja abundancia, mayor precio energético por lo tanto mayor precio.

Consumir zooplancton es más energético que fitoplancton pero los requerimientos actúan de manera inversa:  $e_y > e_x$  y  $r_y < r_x$

Si el objetivo de todo consumidor es maximizar la utilidad ( $u$ ), es decir el nivel de satisfacción cuando un viene s consumido, la prioridad de las sardinas se basa en alcanzar un nivel de energía ( $E$ ), el cual cierto porcentaje tiene que ser suplico por el bien básico, asumiendo que  $r_x$  es constante para garantizar la supervivencia, por lo tanto los límites de supervivencia son;  $e_y y + e_x x \geq E$

Una vez adquirido el nivel mínimo, hay un incremento del consumo de la mayor energía posible. La cantidad de  $E$  se obtiene de la energía adquirida durante la alimentación (energía ingerida por gramo de tipo de presa), a menor en la energía invertida en capturar una presa (relacionada con su abundancia) y asumiendo que los requerimientos para la supervivencia están suplidos, si la abundancia es alta (bajo precio), más energía será invertida en seleccionar las presas. Asumimos que las sardinas no pueden adquirir  $E$  simplemente consumiendo el bien energético, la dieta requiere de un equilibrio entre ambos bienes, que descansa en la intersección donde el nivel de energía de subsistencia se ha alcanzado y las limitaciones de renta. La renta ( $I$ ) está determinada por la necesidad de subsistencia y la riqueza, se considera la energía invertida por encima del nivel de subsistencia en el bien rico, determinado por la abundancia. Las limitaciones de las renta determinan que el otro factos condicione la demanda;  $I \geq xp_x + yp_y$

Siendo las demandas de los bienes  $D_x$ , y  $D_y$ , donde:

$$D_x = (Ep_y - e_y I) / (e_x p_y - e_y p_x) \text{ y } D_y = (e_x I - Ep_x) / (e_x p_y - e_y p_x) \quad (20,21)$$

Para observar un comportamiento Giffen en el bien básico, un incremento en el precio tiene que aumentar el consumo, dando;  $\Delta D_x / \Delta p_x > 0$ , como se muestra en la figura 11.

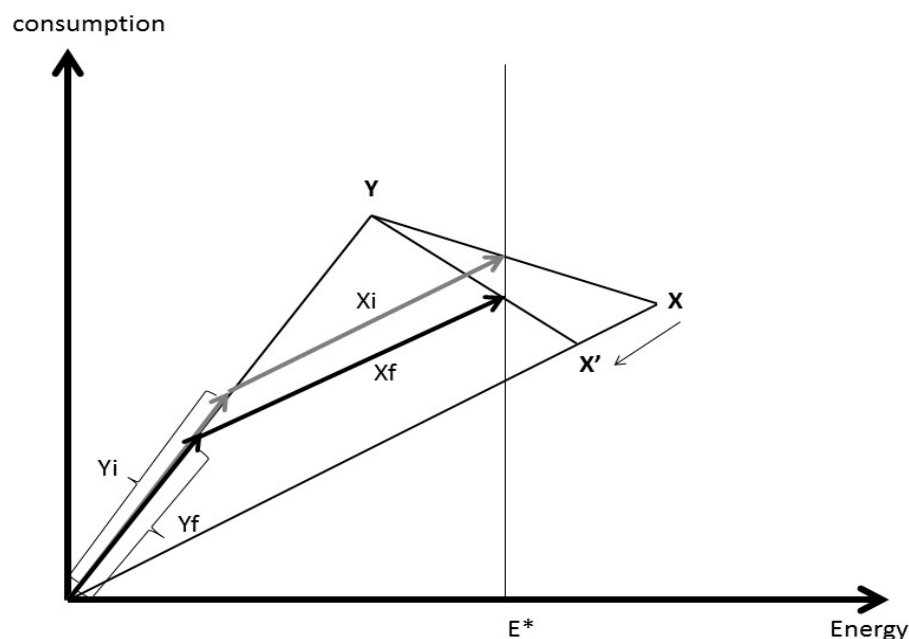


Figure 11 Esquema de la respuesta de la demanda con respecto a un cambio de precio de los bienes estudiados considerando que el bien básico ( $x$ ) es un bien Giffen, teniendo en cuenta que nos encontramos ante consumidores de subsistencia (siguiendo el modelo de Jensen-Miller (Jensen and Miller 2002; 2007; 2008)). Donde  $Y$ , representa la demanda del bien energético y  $X$  la del bien básico ( $Y_i$  y  $X_i$  en el momento inicial y  $Y_f$  y  $X_f$  después del cambio de precio, respectivamente).  $X'$  representa la nueva demanda del bien básica tras el incremento de precio y  $E^*$  indica el límite energético que garantiza la supervivencia. Fuente: Costas et al. (2015).



#### **4.- Investigación aplicada: implementar soluciones biotecnológicas relacionadas con el fitoplancton.**

##### **4.1. Mejora genética de microorganismos por selección artificial**

#### **¿Podemos seleccionar microorganismos para la obtención de cepas mejoradas en un carácter de interés?**

Hemos realizado dos métodos de selección artificial por mejora genética en microorganismos para dos procesos biológicos de interés:

- Biodegradación de microcistina LR por bacterias.
- La captura activa de uranio mediada por microalgas para la biorremediación de aguas de minería de uranio.

La **mejora genética** se efectuó por diferentes procedimientos de selección artificial en función de la aptitud de interés. La respuesta a la selección artificial fue estimada en función de la respuesta a la selección ( $R$ ), de acuerdo con Falconer (Falconer & Mackay, 1996):

$$R = \bar{P}_a - \bar{P}_b \quad (22)$$

donde  $\bar{P}_a$  y  $\bar{P}_b$  son las medias del valor fenotípico de la población microbiana antes y después de la selección respectivamente, expresado como el Uranio total recuperado en mg de U por gramo de biomasa seca o como ppb de microcistina en el agua.

La ecuación anterior no sirve como medida predictiva porque hace una descripción del resultado de la selección, puesto que  $\bar{P}_b$  se obtiene al final del proceso de selección midiendo la población resultante del proceso. De acuerdo con Falconer (Falconer & Mackay, 1996), la respuesta máxima teórica ( $R_{max}$ ) se estima con la ecuación:

$$R_{max} = ih^2\sigma_p \quad (23)$$

donde  $i$  es la intensidad de selección,  $h^2$  es la heredabilidad y  $\sigma_p$  es la desviación estándar del valor fenotípico de la población. Estimamos  $i$  de acuerdo al normograma de Falconer (Falconer & Mackay, 1996), que depende únicamente de la proporción de la población incluida en el grupo seleccionado. La  $h^2$  es la pendiente de la regresión lineal entre la media de los valores de la población parental (antes de la selección) y de la descendencia (después de la selección), mientras que  $\sigma_p$  se calcula a partir de los valores experimentales, llamada heredabilidad realizada (La  $h^2$  puede calcularse también según la ec. 17).

El **aislamiento** de las cepas microbianas se llevó a cabo con arreglo a las técnicas descritas anteriormente. Las cepas ancestrales utilizadas para los procesos de mejora fueron aisladas a partir de ambientes restrictivos, y presentaban crecimiento positivo bajo las condiciones de interés. Para los procesos de biodegradación de microcistina hemos aislado bacterias presentes en un bloom tóxico de *Microcystis sp.* localizado en Ourense, España. El bloom tóxico se caracterizó por presentar más de 5000 cl/mL de *Microcystis sp.* y una toxicidad estimada de más de 4 ppb de microcistina LR. En el caso del proceso de captación de uranio disuelto en agua, utilizamos cepas de *Chlamydomonas cf. fonticola* (ChIU) aisladas de la charca de minería de uranio localizada en Saelices el Chico e identificadas por secuenciación molecular mediante PCR (Apéndice I), siendo la especie de microalga que presentó mayores densidades numéricas en este ambiente extremo. Detalle microscópico de los microorganismos aislados en sus ambientes naturales puede verse en la Figura 12.

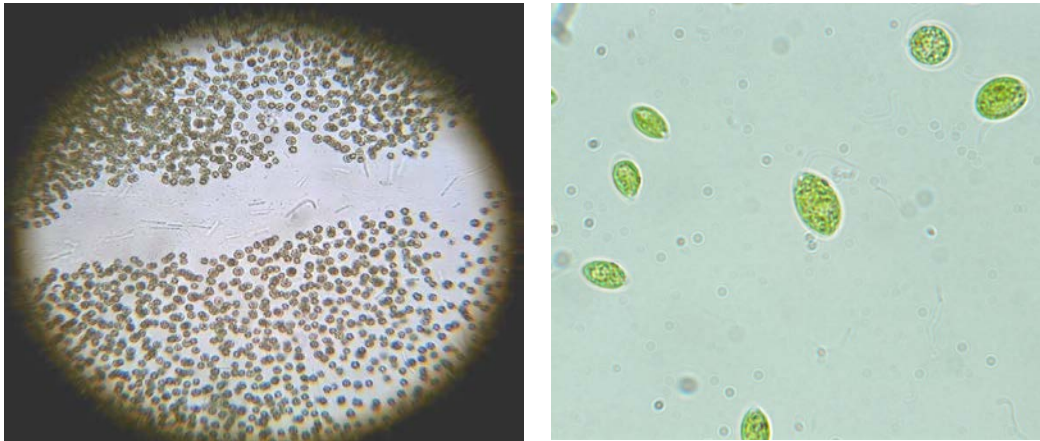


Figura 12. Fotografías de microscopio óptico; izq. detalle de bacterias presentes en un HAB de *Microcystis* sp., localizado en Ourense, España. Drch. ChIU. aislada de la charca extrema de minería de uranio, Salamanca, España.

#### 4.2. Eliminación y biodegradación de compuestos naturales orgánicos: un biofiltro para microcistina.

##### ¿Podemos desarrollar un biofiltro que remueva y biodegrade de manera activa la microcistina en el agua?

Debido a la elevada toxicidad de la microcistina, la OMS recomienda que los niveles máximos de microcistina en agua de consumo sean de  $1\mu\text{g/L}$ , cifra recogida en el Real Decreto 140/2003 de la legislación española. En relación a la importancia de esta problemática, proponemos el desarrollo de un biofiltro para la eliminación de microcistina LR como método alternativo a los tratamientos convencionales.

##### *Mejora genética de bacterias degradadoras de microcistina LR*

Primero, identificamos la aptitud de interés en las cepas aisladas. Las colonias bacterianas aisladas del bloom tóxico de Ourense (Fig.12), fueron transferidas a placas de agar R2 con 2 ppb de microcistina LR, e incubadas durante 72h a  $30^{\circ}\text{C}$ . Todas aquellas cepas capaces de presentar crecimiento positivo fueron identificadas como posibles degradadoras, y seleccionadas para los experimentos de selección artificial.

Posteriormente, una vez establecidos los aislados tolerantes a dosis elevadas de microcistina, iniciamos el proceso de selección positiva por gradiente de concentración, favoreciendo aquellas bacterias capaces de biodegradar de microcistina. La selección se llevó a cabo mediante el incremento gradual de la restricción nutricional imponiendo como fuente única de carbono dosis crecientes de microcistinas LR. La eficacia del proceso de selección se basa en la obtención de cepas seleccionadas capaces de utilizar la microcistina LR como fuente única de carbono. Para ello primero llevamos a cabo una transferencia de las cepas bacterianas aisladas a tres replicados de 100 ml de medio líquido compuesto por agua destilada, medio mínimo M9 (compuesto únicamente por sales y nitrógeno) y con 0,5 ppb de microcistina LR, en Erlenmeyer de 250 ml, con tapón de intercambio de gases, mantenidos en oscuridad y a  $30^{\circ}\text{C}$ . Los replicados se propagaron durante 72h y aquellos que presentaron crecimiento positivo fueron transferidos a medio fresco bajo las mismas condiciones. Tras tres transferencias seriadas manteniendo la misma presión selectiva, aquellos replicados que presentaron crecimiento positivo fueron transferidos a presiones selectivas mayores con menor concentración de medio M9 y concentraciones mayores de microcistina LR. La presión selectiva se fue incrementando hasta niveles de 2,5 ppb de microcistina LR. Al final del proceso de selección, tras aproximadamente tres meses, se

obtuvieron 4 cepas bacterianas capaces de crecer en medios con 2,5 ppbs de microcistina LR y 20% de medio M9. Estas cepas fueron evaluadas para determinar su capacidad real para biodegradar microcistina LR.

La capacidad de biodegradación de microcistina LR se llevó a cabo mediante el análisis de la concentración de microcistina LR inicial y tras 72h, de cultivos en agua destilada con M9 al 20% y 2,5 ppb de microcistina LR en Erlenmeyer de 250 ml, inoculados con las bacterias seleccionadas. Los cultivos se mantuvieron con tapón de intercambio de gases, en oscuridad y a 30°C. Aquella cepa cuyo potencial degradador era mayor, fue identificada por secuenciación molecular mediante PCR (Apéndice I) y depositada en la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT).

#### *Exposición detallada de la realización la invención*

El funcionamiento general del biofiltro se basa en hacer pasar el fluido a través de un lecho de biomasa fijada sobre un soporte inerte, que forma una película denominada biofilm. Las sustancias contaminantes son absorbidas en el lecho de biomasa donde la biopelícula formada principalmente por microorganismos, llevará a cabo la digestión de los compuestos contaminantes. El biofiltro consta de un soporte inerte colonizado por un cultivo bacteriano.

Dentro de los materiales estudiados como soporte inerte se encuentran: la sepiolita natural SG62 (un filosilicato), piñones enteros, piñones triturados (3-4 mm), arena silícica, mixta de arena silícica y piñones, mezcla de piñones enteros y triturados, y carbón activo (los materiales minerales fueron suministrados por la empresa Tolsa®, desinteresadamente). Se dio prioridad a materiales residuales, que sean excedentes de otros procesos productivos, con alta capacidad adsorbente. Todos los materiales fueron prelavados con agua destilada y se llevaron a cabo ensayos para determinar su capacidad como material sorbente de microcistina, seleccionando aquel que se asemejase más a la máxima captación determinada por carbón activo

En nuestro caso, la biopelícula empleada está conformada por bacterias de la especie *Raoultella planticola*, seleccionadas y depositadas en la CECT (nº de la cepa: 8390). Para ello, un inóculo de dicha cepa se siembra en placas de cultivo de Agar bacteriológico R2 y se cultivan a 30°C en oscuridad. Una vez las placas presentan un crecimiento celular elevado, se lleva a cabo la perforación de la placa Petri y se colocará en el biofiltro. En concreto, se colocaron dos: uno a unos cinco cm de la superficie y otro (que se considera de seguridad), a dos cm de la parte inferior (salida) de la columna. Con el material seleccionado y las placas petri crecidas con la bacteria degradadora, se llevará a cabo el montaje del biofiltro (figura 13).

Una vez acondicionado el biofiltro, para el tratamiento de agua contaminada con microcistina se procederá del siguiente modo: el agua a tratar alimentará al biofiltro (1) a través de una válvula que regula el caudal de entrada (2) que se sitúa a la entrada del mismo. El agua drenará a través del biofiltro (3) y el tiempo de retención se controlará a través de una bomba (4) situada a la salida del mismo. Finalmente, el agua tratada se recuperará a la salida del biofiltro (5).

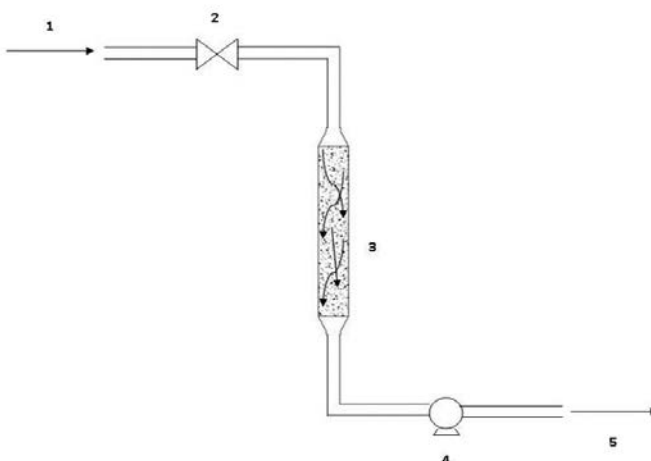


Figura 13. Diagrama esquemático del biofiltro. Fuente; Patente

Un prototipo a escala real del filosilicato inoculado con la bacteria *Raoultella planticola* fue probado a nivel de laboratorio y a escala real en condiciones naturales, por diferentes empresas de agua a nivel nacional. El biofiltro fue rellenado con un filosilicato y placas de Agar con la bacteria seleccionada, fueron colocadas a diferentes alturas para que colonizaran la sepiolita. El biofiltro fue rellenado con un filosilicato y placas de Agar con la bacteria seleccionada, fueron colocadas a diferentes alturas para que colonizaran el soporte sorbente. La colonización del material por parte de la bacteria fue comprobada por MEB.

#### 4.3. Recuperación de Uranio mediante ChIU

##### ¿ChIU mejorada es capaz de capturar uranio de manera activa? ¿Cuánto y cómo lleva a cabo esa captura?

Los experimentos con uranio se llevaron a cabo con medios preparados en el CIEMAT, con una concentración conocida de uranio en agua, enriquecida con BG-11. En aquellos apartados en los cuales nos referimos a agua de Saelices, se trata de agua de minería de Uranio (con un contenido de 25mg/l de Uranio y otros metales disueltos), filtrada y enriquecida con medio BG-11. El uranio total de un cultivo se valoró de forma directa sobre muestras del cultivo digeridas con un tratamiento de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 2% v/v. Las muestras de pellets analizados se sometieron a un secado en estufa a 60°C hasta peso constante. Para determinar la cantidad de metal que contenía la biomasa microalgal, se pesaron los gramos de (previamente secada en estufa a 60°C) se sometieron a un tratamiento con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 2% v/v, que permite la digestión de los pellets de biomasa, la disolución se preparó añadiendo un volumen conocido de ácido nítrico. En el caso de los sobrenadantes la determinación se llevó a cabo de manera directa sobre muestras filtradas a 0,22 micras. Las medidas de uranio fueron llevadas a cabo por el CIEMAT y los CAI de la Universidad Complutense de Madrid.

#### Mejora genética para la captura de Uranio

La aptitud de ChIU para la captación de uranio, fue valorada mediante análisis de dispersión de rayos X sobre cortes de MET para evaluar si eran capaces de bioconcentrar y la biolocalización de los agregados de uranio. El microanálisis de rayos X es una herramienta que permite analizar pequeños micro-volúmenes (del orden de  $\mu\text{m}$  o  $\text{nm}$ ) presentes en las estructuras de los especímenes que observamos en el microscopio electrónico. Proporciona información cualitativa y cuantitativa de su composición. Esta técnica analizar permite los elementos de la tabla periódica, incluyendo los elementos ligeros desde el Boro. El microscopio utilizado fue un JEOL JEM-2010 (Jeol Ltd., Tokio, Japón), equipado con espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDSX) con una resolución de 133 eV a 5.39 keV. El análisis resultó en una identificación positiva de uranio (detalle en la figura 12), tanto en estructuras intracelulares como en la pared celular. Los análisis se llevaron a cabo en los CAI.

El género *Chlamydomonas* presentan principalmente polisacáridos y carbohidratos en la pared celular con cargas negativas que atraen cationes como el Uranio (Imam, Buchanan, Shin, & Snell, 1985; Kalin, Wheeler, & Meinrath, 2005), siendo un proceso no selectivo. Teniendo en cuenta que el tamaño y la composición química de las microalgas es relativamente constante (Kalin et al., 2005), podemos deducir que el número de ligando aumentará con el tamaño celular y la captación de uranio disuelto será mayor.

Hemos aplicado una selección por tamaño basada en velocidad de caída en un líquido viscoso, la cual está influida principalmente por el diámetro de las células. La

selección por tamaño en un fluido viscoso en régimen laminar con bajo número de Reynolds, sigue la ley de Stokes: la velocidad de caída de una esfera viene determinada por la fuerza de gravedad, la densidad de la partícula y el radio de la partícula, en contra de la densidad y viscosidad del fluido. La ecuación de la velocidad límite se calcula;

$$v_l = \frac{2g(\rho_e - \rho_f)R}{9\eta} \quad (24)$$

donde  $V_l$  es la velocidad de caída de la célula (velocidad límite),  $g$  es la fuerza de la gravedad,  $\rho_e$  es la densidad de la célula,  $\rho_f$  es la densidad del fluido,  $\eta$  es la viscosidad del fluido y  $r$  es el radio equivalente de la célula.

En sistemas con flujo laminar lento, todas las variables son constantes menos la densidad y el radio celular, y que el radio influye más en la velocidad de sedimentación que la densidad.

Previamente a la selección, 300 aislados independientes de ChIU fueron inoculados en medio de cultivo, permitiendo la recombinación para maximizar la variabilidad genética. Mediante el seguimiento del cultivo a lo largo del tiempo, se pudo valorar los procesos de recombinación celular mediante la observación de formas reproductivas. Hemos utilizado una bureta de 60 cm de longitud y diámetro de 11,8 cm, cubierta con materiales que no permiten el traspaso de la luz e iluminada solo en la parte superior y con medio de cultivo hasta la altura de 50 cm. En la parte superior de la bureta hemos añadido una población de en torno a 100 millones de células, causando la mínima turbulencia posible y permitiendo a las células sedimentar. Únicamente las células que presentaron mayor velocidad de sedimentación, aquellas que llegaron más rápidamente al final de la bureta, fueron seleccionadas para la siguiente generación. Las células seleccionadas se transfieren a medio de cultivo fresco y se propagan durante dos semanas hasta el siguiente ciclo selectivo. Este proceso fue repetido a lo largo de 12 meses. La respuesta al proceso selectivo se determinó midiendo la capacidad de captación de uranio antes y después de la mejora. La población seleccionada para una máxima eficiencia a la hora de recuperar uranio, fue depositada en el Banco Español de Algas (BEA) con el número de depósito D04-12.

#### *Monitorización de la captación Uranio in-vivo*

Mediante la exposición a luz UV (espectro inferior a 405 nm) y posterior monitorización a longitudes de onda comprendidas entre 510 y 700 nm, hemos monitorizado *in-vivo* la captación de uranio por parte de las células<sup>21</sup>. Las células fueron fácilmente monitorizadas gracias a la fluorescencia emitida por la clorofila. Mediante microfotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE2000E equipado con un filtro de bloqueo (Nikon, Japan), acoplado a un monocromador Optoscan Carin (Carin, UK) con un Prior Proscan XYZ, un monitorizador en directo sobre una plataforma vertical (Prior Scientific Ltd., UK). Una caja de incubación (H201 Okolab S.r.l., Italia) fue acoplada a la plataforma del microscopio para mantener las condiciones constantes durante la medida (22°C y niveles de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> atmosféricos).

Células de la cepa de ChIU mejorada genéticamente en medio BG-11 libre de Uranio fueron depositadas en una placa multipocillo (Nunclon, Dinamarca), pre-tratada con poli-

---

<sup>21</sup> El Uranio presenta una fluorescencia natural, descrita por Becquerel en 1872, presentando valores máximos de fluorescencia a longitudes de onda comprendidas entre 494 y 565 nm, y el límite de detección mediante luz ultravioleta es de 0,1 µg/l (Moulin, Decambox, & Mauchien, 1997). El uranio ha sido detectado en diferentes organismos por medio de técnicas de fluorimetría (Premadas & Srivastava, 1999).



L-lisina (un compuesto químico que fija las microalgas limitando su movimiento y facilitando la medida). Después de 24 horas de incubación, inmediatamente antes de empezar a gravar, los pocillos fueron cargados con medio BG-11 enriquecido con Uranio a 25 mg/l; un pocillo fue cargado con BG-11 sin Uranio, actuando como control. Los pocillos fueron secuencialmente iluminados con luz monocromática a 365, 480, 547 y 635 nm. La luz emitida fue aislada en bandas individuales mediante el paso a través de filtros de 510, 520, 590 y 700 nm, respectivamente. Las microfotografías fueron tomadas usando una cámara de alta resolución Hamamatsu CCD C4742-98 (Hamamatsu, Japón). El tiempo de exposición fue de menos de 800ms a cada longitud de onda. Todos los aparatos fueron controlados por un software MeteMorph (Molecular devices, USA). Para cada longitud de onda, series de 3 imágenes separadas por 5µm a lo largo del eje Z, fueron tomadas cada 10 minutos a lo largo de 22 horas. La trayectoria temporal de los datos representa la intensidad máxima de luz en una pequeña región elíptica dentro de cada célula. Al final del experimento, la viabilidad de las células fue valorada por microscopía óptica.

#### *Determinación de la biosorción de uranio por Chlamydomonas sp.*

Con el objetivo de hacer una aproximación biotecnológica, hemos realizado un experimento para valorar la biosorción en vivo de uranio por la cepa ChIU mejorada en condiciones controladas. Para ello, fundamos 3 cultivos replicados con medio BG<sub>11</sub> y 4 ppm de uranio disuelto, en cajas de cultivo celular greiners bio-one® de 650 mL con 85 mL de volumen de trabajo, mantenidos a 22°C e iluminación continua. Los replicados se inocularon a partir del mismo cultivo de *Chlamydomonas sp.* con una concentración inicial de medio millón de células por mL. La curva de concentración de uranio fue obtenida por medio de la valoración a diferentes tiempos (inicial, 3, 9, 12, 24 y 36 días) de la cantidad de uranio presente en el pellet celular y el sobrenadante. El pellet se obtuvo por medio de la centrifugación durante 3 minutos a unos 2000 g y su posterior desecación hasta peso constante. Este experimento nos permite valorar la capacidad de esta cepa para recuperar activamente uranio, el tiempo tarda en eliminar prácticamente la totalidad del uranio del medio y si hay indicios de procesos de desorción.

Por otro lado, para valorar la capacidad de biacumulación y bioadsorción, se inoculó un número grande de células (en torno a 10<sup>5</sup> células), en un volumen conocido de disolución con uranio y nutrientes (agua de Saelices enriquecida con medio BG<sub>11</sub>, conteniendo 25mg/l de Uranio) y se propagó en fase de crecimiento exponencial. Para la eliminación del uranio disuelto en el medio, se realizaron 5 ciclos sucesivos de centrifugación (durante 3 min a aprox. 2000 g) y re-suspensión del pellet obtenido en agua bidestilada estéril (el sobrenadante del último lavado fue analizado para comprobar la ausencia de Uranio en el medio). Se obtuvieron pellets de en torno a 70 millones de células (el número de células fue cuantificado mediante conteo en cámaras de sedimentación en microscopio óptico). Los pellets, todos con una concentración celular de en torno a 70 millones de células, fueron divididos en 2 grupos;

- Replicados para el análisis de la recuperación total de Uranio. Los pellets fueron directamente tratados para caracterización química.

- Replicados para el análisis de la biacumulación de Uranio. Estos últimos replicados fueron re-suspendidos en 4 ml de agua bidestilada con 1 ml de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0,05%, durante 15 minutos. Posteriormente se llevaron a cabo 3 ciclos de centrifugación y lavado en agua bidestilada estéril. Los pellets resultantes fueron tratados para caracterización química.

El EDTA es un agente quelante de cationes divalentes, con una constante de afinidad muy elevada por el Uranio (Panak et al., 2000). Con el fin de valorar las mejores condiciones para la eliminación del Uranio superficial presente en la pared microalgal, se procedió al lavado de las células con tres disoluciones de EDTA de concentraciones 0,05%, 0,03% y 0,01%. El criterio de selección se basó en dos aspectos: 1) la efectividad en la eliminación de uranio de la pared celular; 2) que las condiciones no resultaran destructivas o desestabilizadoras para las células (evitar la rotura de la pared celular). La efectividad en el lavado se valoró a través del análisis químico de uranio y el daño celular mediante de la observación a través de microscopio óptico invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany). Asimismo la viabilidad de las células se valoró mediante fluorescencia. Al final viendo que no afectaba a las células y que la mínima concentración eliminaba todo los acúmulos presentes en la pared celular se utilizó la concentración de 0.01% de EDTA.

#### *Experimento de Fraccionamiento isotópico de Uranio.*

Se llevó a cabo un experimento para medir: la capacidad del fraccionamiento del alga tras un periodo de tiempo y para ver la cinética de fraccionamiento a lo largo del tiempo.

En greiners de cultivo se fundaron 5 replicados con 85 ml de medio estéril con 4 ppm de uranio y enriquecido con BG-11, y se inocularon con aproximadamente 10 millones de células de la cepa mejorada *Chlamydomonas cf. fonticola*. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de crecimiento exponencial y luego en fase estacionaria de cultivo a 22°C y luz constante durante 36 días. Para valorar el fraccionamiento se tomaron muestras a los 24 días de todos los replicados y a diferentes tiempos para hacer la cinética de fraccionamiento.

Las relaciones isotópicas  $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$  fue calculada mediante la ecuación;

$$\delta^{235}\text{U} = \left( \left[ \frac{(U_{235}/U_{238})_{\text{muestra}}}{(U_{235}/U_{238})_{\text{medio}}} \right] - 1 \right) \times 10^3 \quad (25)$$

siendo el medio, la relación isotópica del medio de cultivo previo a la introducción de las microalgas y la muestra, pudiendo ser el pellet de microalgas o el sobrenadante tras el filtrado de la biomasa.

Si el  $\delta > 0$ , indica un fraccionamiento isotópico.

Otro factor para medir la magnitud del fraccionamiento sería  $\alpha$ , definido como:

$$\alpha = \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{medio}}} \quad (26)$$

Siendo  $R_{\text{muestra}}$  y  $R_{\text{medio}}$  la relación de  $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$  respectivamente. Normalmente se expresa en términos de  $\varepsilon$ , una cuantificación por mil, definida como:

$$\varepsilon = 1000 \times (\alpha - 1)$$

Para la medida de las relaciones isotópicas se utilizó un espectrómetro de masas con fuente de plasma THERMO ELEMENT XR con sistema analizador compuesto por un sector magnético y un sector electrostático (HRICP-MS).





## VI. RESULTADOS

*“We must be prepared to learn some day, from the students of microscopical pond-life, facts of unconscious mutual support, even from the life of microorganisms”*

Kropotkin’s prediction (Kropotkin, 1902)



## CAPÍTULO I

### ADAPTACIÓN DEL FITOPLANCTON AL CAMBIO GLOBAL.

*Variation is ubiquitous and random in direction. It supplies raw material only. Natural selection directs the course of evolutionary change.*

Stephen Jay Gould (1977)

Las perturbaciones mediadas por la acción humana representan un desafío para el futuro de las poblaciones, pero al mismo tiempo, incitan a la evolución contemporánea. Entender los posibles efectos de la evolución rápida en las dinámicas de los ecosistemas naturales resulta crítico para predecir como las poblaciones se adaptarán a presiones selectivas antropogénicas.

#### ➤ I.I. Adaptación diferencial del fitoplancton a los posibles escenarios de calentamiento global.

En el presente capítulo hemos llevado a cabo dos trabajos enfocados al estudio de la capacidad de adaptación del fitoplancton a diferentes escenarios de cambio global, tratando de abordar un amplio número de especies. De esta manera hemos hecho un abordaje amplio dentro de diferentes nichos ecológicos para hacer predicciones sobre sucesos de extinción masiva, homogenización de biotas y posibles proliferaciones de especies oportunistas.

- El primer trabajo del presente capítulo lleva a cabo un estudio de cinco especies de fitoplancton, la más común en ambientes de agua dulce *M. aeruginosa*, tres de zonas costeras representando a las algas verdes, *T. suecica*, el dinoflagelado *P. triestium* y la diatomea *N. closterium*. Por último también se estudió la especie oceánica *I. galbana*. En este trabajo se hizo un abordaje con un gran número de clones valorando la plasticidad fenotípica, la adaptación mediada por la variabilidad genética tanto de los diferentes genotipos como por último las mutaciones espontáneas presentes a baja frecuencia en las poblaciones. Ninguna de las especies pudo adaptarse a temperaturas de 40°C, siendo *M. aeruginosa*, *T. suecica* e *I. galbana* las especies que presentan una capacidad de adaptación a mayores temperaturas, capaces de adaptarse hasta 35°C. Además, estas tres especies, presentan una gran variabilidad genética en las poblaciones con mayor capacidad para tolerar incrementos más moderados de temperatura, pudiendo ser posibles especies oportunistas bajo escenarios de elevados incrementos de temperatura.
- En el segundo trabajo, nos centramos en estudiar un amplio número de especies de diferentes nichos marinos, concretamente 12, nueve de ellas costeras y tres especies de océano abierto. En este estudio medimos la heredabilidad, es decir la varianza genética, del componente de fitness frente a: escenarios de temperatura actual, escenarios de bajo y alto incremento de temperatura de la superficie del mar (ITSM). Además, también se valoró la respuesta de la variabilidad genética dentro de los clones estudiados. Los resultados determinaron que la adaptación a

la temperatura, tanto actual, como en posibles escenarios de bajos ITSM, presenta una heredabilidad alta, lo cual indica que la variabilidad observada puede atribuirse a factores genéticos y sugiere poca influencia de ese ambiente determinado en la varianza fenotípica en fitness. En el caso de escenarios poco optimistas, las especies presentaron mayor variabilidad en los valores de heredabilidad siendo baja en *P. marinus* y *N. closterium*, *P. triestinum*, *S. trochoidea* y *O. luteus*. Esto indica que presentan un gran potencial de adaptación, sin embargo frente a elevados ITSM algunas especies de fitoplancton marino pueden ver muy reducido su potencial, siendo *N. closterium* la especie más afectada con heredabilidades cercanas a 0.

**I.I.I. Phytoplankton Ability to Physiological  
Acclimatization and Genetic Adaptation to Global  
Warming.**



































**I.I.II. Estimating the genetic capability of different  
phytoplankton organisms to adapt to climate warming**





















## ➤ I.II. La evolución rápida como respuesta a escenarios de estrés antropogénico.

En este primer capítulo nos preguntamos si la adaptación rápida en microorganismos es suficiente para suponer un factor clave en la persistencia o la extinción local de las poblaciones. Estudiamos la adaptación a contaminantes antropogénicos, valorado las posibles respuestas de diferentes grupos de especies en escenarios de contaminación aguda por metales. Por otro lado hemos estudiado y analizado la persistencia de poblaciones *in situ* a ambientes extremos generados por la actividad humana, concretamente charcas de lixiviación de minería de uranio. Entre los contaminantes antropogénicos estudiados se han seleccionado dos metales: el osmio y en berilio, y el estudio de dos ambientes extremos de minería de uranio localizados en la Península Ibérica.

- El primer trabajo consiste en una revisión del estado del conocimiento con respecto a la adaptación rápida del fitoplancton al cambio global, abordando estudios evolutivos transgeneracionales en laboratorio y en condiciones naturales, a ambientes extremos y a estresantes antropogénicos.
- En el segundo trabajo hemos estudiado la adaptación al osmio. El osmio es un metal común en la corteza terrestre, pero debido a la actividad industrial grandes cantidades de osmio están siendo liberadas a la atmósfera (Barbante, Veyseyre, & Ferrari, 2001). Siendo un metal especialmente tóxico incluso considerándose algunos de los compuestos químicos que forma agentes de guerra química, como tetraóxido de osmio. Sin embargo, se sabe poco de sus efectos sobre el fitoplancton. En este estudio hemos evaluado el efecto del este metal sobre la capacidad de adaptación del fitoplancton proveniente de diferentes nichos ecológicos: agua dulce, costera y marina.
- En el tercer trabajo estudiamos la adaptación al berilio. Las cantidades de berilio liberadas en el ambiente se han visto incrementadas en los últimos años (TRI99, 2002). Este metal es altamente tóxico para el ser humano y para los ambientes acuáticos. (Edmunds & Trafford, 1993; Vesely et al., 2002). Por ello, hemos estudiado la capacidad de adaptación a este contaminante.
- El cuarto trabajo estudia dos charcas de lixiviación de minería de uranio. Estos ambientes extremos localizados en el área minera de Saelices el Chico, Salamanca. Presentan un pH bajo, radiactividad y altas concentraciones de metales tóxicos, siendo el uranio el más abundante de los metales analizados. Valoramos la capacidad de adaptación a estos ambientes extremos por parte de organismos fitoplanctónicos de los mismos géneros a algunas de las especies encontradas: *Chlamydomonas sp.* y *Dictyosphaerium sp.* Por último hemos valorado la influencia de la recombinación dentro de la adaptación rápida a ambientes extremos.

Los resultados de la revisión y los tres trabajos experimentales muestran que las poblaciones microalgales son capaces de adaptarse a altas presiones selectivas por medio de mutaciones espontaneas presentes en las poblaciones. Estas mutaciones tienen lugar con antelación a la exposición al agente selectivo. En algunos casos extremos donde se ejercen varias presiones selectivas combinadas, como el agua de minería de uranio localiza en la localidad Salmantina de Villavieja, la adaptación no tuvo lugar en poblaciones propagadas mediante expansión clonal. Sin embargo, la recombinación resultó una vez más como un mecanismo que facilita la adaptación.





### **I.II.I Mechanisms of Rapid Adaptation to Environmental Stressors in Phytoplankton.**



































**I.II.II Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining:  
An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonize extremely toxic environments.**





















**I.II.III. Rapid adaptation of some phytoplankton species to osmium as a result of spontaneous mutations.**





















**I.II.IV. Adaptation prevents the extinction of  
*Chlamydomonas reinhardtii* under toxic beryllium.**

























































## CAPÍTULO II

### COMPLEJIDAD ECOLÓGICA DENTRO DE UNA TRANSICIÓN; EL ORIGEN DE LA MULTICELULARIDAD.

*Beneath the outward harmony of living organisms lies an often contentious history of transitions to ever more inclusive, hierarchically nested levels of biological organization.*

Grosberg and Strathmann, 2007.

En este segundo capítulo, hemos hecho un abordaje para valorar la influencia de condiciones ambientales diferentes, en la evolución de una transición evolutiva. Hemos estudiado el origen de la multicelularidad desde una perspectiva de complejidad ecológica por medio del microorganismo modelo eucariota más estudiado: *S. cerevisiae*. Capitalizando el modelo desarrollado por Ratcliff et al. (2015), hemos realizado diferentes experimentos, basados en la selección por sedimentación, para evaluar el efecto de la disponibilidad nutricional sobre el desarrollo y estabilidad de fenotipos multicelulares. Como resultados, en el experimento de selección por sedimentación partiendo de cepas unicelulares, hemos obtenido que diferencias entre los cinco sets de cultivos propagados bajo diferentes condiciones selectivas y nutricionales. Ninguno de los dos sets en los cuales no se aplicó selección por sedimentación dieron lugar a fenotipos *snowflake yeast* multicelulares. En el caso de los tres sets en los que se aplicó selección por sedimentación, al menos la mitad de los replicados presentaron el fenotipo *snowflake yeast*. Sin embargo, la evolución de los diferentes replicados presenta un mayor varianza en la distribución poblacional en MM y que en RM. En el caso de RM, todas las poblaciones presentaron preferentemente el fenotipo multicelular *snowflake yeast* y baja o nula presencia del fenotipo ancestral unicelular tras 60 días de experimento. En cambio, en MM, el salto a la multicelularidad solo tuvo lugar en 6 de los 10 replicados, presentando los diferentes replicados de distribuciones fenotípicas distintas dentro de las poblaciones: lo que consideramos unicelulares puros, multicelulares puros (no se detectan fenotipos unicelulares) y población mayoritariamente unicelular con algunos fenotipos pluricelulares. Por último, el set 5, en el cual conmutamos el medio de MM a RM en el día 40 de experimento, presenta en todos los replicados fenotipos multicelulares y persistencia de los fenotipos unicelulares en la mayoría de los replicados. Estos resultados indican que el fenotipo *snowflake yeast* tiene lugar bajo condiciones de restricción nutricionales (MM), siendo el mismo fenotipo que en condiciones no restrictivas (RM). Estos resultados indican que la restricción nutricional no impide que los fenotipos *snowflake yeast* tengan lugar, sin embargo los resultados sugieren que en medio MM tiene lugar un incrementando de la contingencia del proceso. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la complejidad ecológica podría tener un papel determinante dentro de esta transición evolutiva, influyendo en la probabilidad de que esta pueda tener lugar. Por otro lado, el experimento de reversión sugiere que una vez adquirida la multicelularidad, no parece haber una reversión hacia la unicelularidad en MM.





#### **IV.I. Ecological complexity within a transition: evolution of multicellularity**

Referencia:

**Beatriz Baselga-Cervera** & Michael Travisano. Ecological complexity within a transition: evolution of multicellularity (in preparation).



### CAPÍTULO III

#### MODELOS DE COMPETENCIA DE POBLACIONES EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS, DINÁMICAS EVOLUTIVAS DE COMPORTAMIENTO.

*“The difference in mind between man and the higher animals, great as it is, certainly is one of degree and not of kind.”*

The Descent of Man (Charles Darwin, 1871)

Una de las utilidades de la evolución experimental es como “prueba de concepto” de hipótesis o comportamientos biológicos. En este capítulo hemos realizados dos trabajos experimentales en combinación con abordajes matemáticos, desarrollando dos modelos para explicar comportamientos biológicos desde un punto de vista evolutivo.

La realidad es que dentro de los HABs de cianobacterias tiene lugar la coexistencia de genotipos tóxicos y no tóxicos.

Desde esta perspectiva, llevamos a cabo un abordaje alternativo a la problemática de los HABs de *M. aeruginosa*. Por lo tanto, abordamos esta problemática desde un punto de vista de Teoría de Juegos Evolutiva (TJE): ¿por qué las cianobacterias presentan ambos genotipos dentro de un HABs? La teoría de juegos es una herramienta útil para explicar comportamientos que en principio no concuerdan con la selección del más apto. Como resultado del modelo, ninguna de las estrategias evolutivamente estables (EEE) de la matriz de pagos, estrategias que una vez adoptadas por la población no pueden ser invalidadas por otra estrategia alternativa, presentaba una distribución de coexistencia de ambos genotipos. La hipótesis planteada fue una solución basada en un equilibrio por selección dependiente de frecuencias, en el cual la aptitud de un genotipo depende de la frecuencia relativa con respecto a los demás genotipos. Frente a esto, para explicar la predominancia de los genotipos productores, hemos modelizado una solución basada en el altruismo por selección de parentesco a la presencia de genotipos tóxicos –cooperadores- y no tóxicos –desertores- dentro de los HABs. Los estudios experimentales realizados apoyan nuestro modelo. Los estudios comparativos de fitness biológica entre genotipos productores y no productores, indican un coste en términos de fitness relacionado con la producción de toxina. Por último, en nuestro experimento evolución, maximizando el efecto de cuello de botella, hemos obtenido cambios en las poblaciones con respecto a la producción de toxinas: algunas poblaciones clónicas no productoras, presentaron producción positiva al final del experimento y viceversa.

En este capítulo también planteamos un segundo modelo, un modelo económico en peces como consumidores básicos (concretamente sardinas), asemejando el mar a un mercado de subsistencia. Se asume que las decisiones de los animales se han optimizado hace la ingesta de energía, la oportunidad reproductiva y la supervivencia bajo presiones selectivas. De esta manera llevamos a cabo un modelo basado en la energía como bien de intercambio, es decir, la utilidad es en función de los requerimientos energéticos y el gasto energético invertido en adquirirlos. Según el modelo, los peces presentan conducta similar a la conducta Giffen (excepción a la Ley de la Oferta y la Demanda) con respecto al bien básico (el fitoplancton), cuando éste está presente a bajas concentraciones en la columna de agua. Siendo una conducta que no llevan a cabo cuando la oferta de alimentos es mayor, indicando la fuerte dependencia del consumidor (los peces) con respecto al bien

básico. La función de utilidad está determinada por los requerimientos energéticos mínimos para la subsistencia. Como en el caso anterior, hemos realizado estudios experimentales en ambientes naturales, muestreando sardinas y estudiando el contenido estomacal de las mismas y las densidades de plancton en la columna de agua. Los resultados de los muestreos y la evolución del consumo en función de la oferta por parte de las sardinas, son compatibles con el modelo propuesto de bienes Giffen.

### **III.I. Why Cyanobacteria Produce Toxins? Evolutionary Game Theory Suggests the Key**



































**III.II. Evolutionary Control of Economic  
Strategy in Fishes: Giffen Behaviour could be a  
Common Economic Strategy on the Earth**





















## CAPÍTULO VI

### INVESTIGACIÓN APLICADA: APLICACIONES EN BIOTECNOLOGÍA RELACIONADAS CON EL FITOPLANCTON.

*If one way be better than another, that you may be sure is nature's way*

Aristóteles

En este último capítulo llevamos a cabo un abordaje aplicado derivado de nuestros trabajos de investigación básica sobre la capacidad de adaptación de especies fitoplanctónicas. Ambos abordajes llevados a cabo estudian soluciones naturales frente a cuestiones concretas: la eliminación de microcistinas en agua y biorremediación de aguas contaminadas de minería de uranio.

#### ➤ VI.I Un abordaje biotecnológico a la problemática de los HABs

La principal problemática está relacionada con la ocurrencia de HABs, los cuales se han visto incrementados por la interferencia humana representando un impacto económico importante y un problema ecológico y sanitario (Davis et al. 2009). Dentro de las cianobacterias, *M. aeruginosa* es la especie tóxica más común en agua dulce y la principal productora de microcistina (Oberholster, Botha, & Grobbelaar, 2003), siendo la microcistina uno de los principales riesgos toxicológicos en el agua dulce en todo el mundo debido a su mecanismo de acción.

Hemos implementado un abordaje biotecnológico para eliminar la microcistina del agua de forma eficiente. Hemos aislado de un hábitat natural una bacteria capaz de degradar pequeñas cantidades de microcistina LR y la hemos sometido a un programa de mejora genética por selección artificial. De forma paralela, hemos probado diferentes materiales capaces de retener activamente la toxina. Con estos dos componentes hemos diseñado un biofiltro capaz de eliminar microcistina del agua y degradarla gracias a su componente biológico. Complementariamente llevamos a cabo una serie de estudios en terreno, para valorar la efectividad de la invención. El resultado se trata de un biofiltro de sepiolita inoculado con la bacteria seleccionada *R. planticola*, la cual es capaz de eliminar del agua de forma activa hasta 2,5 ppbs de microcistina. Este biofiltro ha sido probado con éxito en empresas abastecedoras de agua, para la eliminación de microcistinas.





**VI.I.I. Bacteria degradadora de microcistina, biofiltro  
que la incluye así como método de depuración de  
aguas contaminadas con microcistina empleando el  
mismo**







**VI.I.II. Development and performance of *Raoutella Planticola* biofilter for microcystin LR removal.**

Referencia:

**Beatriz Baselga-Cervera**, et al. Development and performance of *Raoutella Planticola* biofilter for microcystin LR removal. (In preparation).



## ➤ VI.II Vivir recuperando Uranio

El otro ejemplo es la capacidad biotecnológica de la clorofita *Chlamydomonas cf. fonticola*, aislada en una charca de lixiviación de minería de uranio en España. La contaminación de los recursos hídricos con uranio es de especial interés debido a su elevada toxicidad (Arfsten et al., 2001; Závodská, Kosorínová-Lenk, & Lesn, n.d.), siendo una de las principales fuentes de contaminación la actividad minera. Teniendo en cuenta la cantidad de metros cúbicos de agua contaminada por uranio que genera España anualmente (World Nuclear Association 2016), y que la extracción resulta demasiado costosa, en este capítulo valoramos la potencialidad de esta microalga como alternativa a los procesos convencionales de minería.

Mediante difracción de rayos X, comprobamos la capacidad de esta cepa para bioacumular y bioadsorber uranio. Esta cepa fue seleccionada para incrementar su capacidad de bioacumular uranio mediante mejora genética, obteniéndose una mejora de hasta tres veces su capacidad inicial de captación. La cepa mejorada fue capaz de captar activamente hasta 10 mg de uranio por gramo de biomasa seca, siendo la captación principalmente mediante bioacumulación en la pared celular. Además, esta cepa al estar pre-adaptada a la charca de minería de uranio, mostró una gran eficacia para captar el uranio disuelto en el agua y reducir su concentración. La cepa seleccionada lleva a cabo un fraccionamiento isotópico durante la biadsorción de uranio a favor de isótopo más ligero.





### **VI.II.I. Microalgae: the first nuclear engineers?**





























**VI.II.II. Genetically Enhanced *Chlamydomonas*  
*sp.* for Uranium Uptake; a joint biological approach  
on uranium-contaminated waters management.**

Referencia:

Eduardo Costas, **Beatriz Baselga-Cervera**, Miguel Diaz, Emma Huertas, Antonio Flores-Moya, Camino García-Balboa & Victoria López-Rodas. Genetically enhanced *Chlamydomonas sp.* for uranium uptake; a joint biological approach on uranium-contaminated waters management. Progress in Nuclear Energy. (Under review).





**VI.II.III. Un Nuevo procedimiento para el fraccionamiento de Uranio.**











**VI.II.IV. Método de recuperación y  
enriquecimiento de uranio mediante biacumulación en  
microalgas mejoradas genéticamente.**









## VII.- DISCUSIÓN

*What is utterly baffling to me is why one cannot be  
reductionist and holist at the same time*

John Tyler Bonner

## VII.-Discusión

Por debajo de la aparente armonía de los organismos vivos yace una historia controvertida de transiciones, casi siempre hacia niveles jerárquicos más inclusivos de organización biológica (Bonner, 1998; Buss, 2014; Carroll, 2001; Grosberg & Strathmann, 2007; Maynard Smith & Szathmary, 1995; Michod, 2000). Las poblaciones contemporáneas son el resultado de la fuerza creadora de la evolución y producto de la interacción de un gran número de contingencias históricas (Monod, 1974), las cuales han estado y están evolucionando en la “lucha por la vida” (Darwin, 1859a). Teniendo en cuenta la siempre presente influencia de la historia evolutiva pasada (concepto promovido por Stephen J. Gould como contingencia histórica o restricciones históricas). Como indicó Felsenstein (1988): *Biological reality is so complex that we are very far from any reasonably mechanistic understanding of evolutionary processes* (pg. 468).

Los linajes evolutivos en las poblaciones naturales constituyen una serie de eventos únicos, probablemente imposibles de reproducir, lo cual dificulta la valoración de los factores responsables de la variabilidad observada o la posibilidad de que el resultado podría haber resultado diferente. Por medio de experimentos de evolución podemos evaluar de manera directa la diversidad de respuestas posibles, pudiendo presentar diferentes soluciones adaptativas frente al mismo desafío ambiental, siendo algunas de ellas inesperadas o no observadas previamente. La evolución experimental complementa otros enfoques fundamentales para el análisis de los procesos evolutivos, presentando cada abordaje tanto ventajas como limitaciones. Como Underwood (1998) señaló: *The hallmark of progressive ideas is that they progress. Given that there is a good chance we are wrong quite often, we should be prepared to discover how wrong as fast as possible.* (pg. 345). Por lo tanto, cabe destacar las críticas más comunes referidas a la selección experimental, para poder detectar los fallos y continuar progresando hacia una metodología más informativa y que comporte menos sesgos. La no-naturalidad de un ensayo in vitro que no representan la complejidad del mundo real, tanto desde el punto de vista de los múltiples factores que influyen en la naturaleza (los ambientes de laboratorio son muy benignos y estables, probablemente atenuando la selección en caracteres que permiten lidiar con las fluctuaciones en el ambiente, predadores, competidores...), como restringiendo respuestas a la selección, por ejemplos eliminado la variabilidad espacial (Rainey & Travisano, 1998) o limitando la compensación comportacional (Huey, Hertz, and Sinervo 2003). Sin embargo, está consciente simplificación que se aleja de la complejidad de la naturaleza permite un control mayor de las variables, permitiendo relacionar la causa y el efecto pudiendo llevar a la identificación de generalidades. Cualquier organismo biológico puede ser objeto de estudio de la evolución, siendo los microorganismos sujeto de la mayoría de los estudios debido a sus irrefutables ventajas. Aunque las extrapolaciones tienen que llevarse a cabo con “cautela”, puesto que pueden comportar sesgos: los microorganismos presentan complejas interacciones sociales y multiplicidad de rasgos comúnmente relacionados con otros organismos como los animales (p. ej. el sexo o el envejecimiento), son posibles si el tipo microorganismo se ajusta a la pregunta. Otra de las críticas más comunes es el abordaje de “macroevolución” o especiación, referida a cambios a nivel o por encima del nivel de especies (p.ej. tendencias o desviaciones del registro fósil), por medio de la evolución dentro de las poblaciones es referida tradicionalmente como “microevolución” o adaptación. Este tipo de escaladas conllevan dos retos: los organismos actuales no son los mismos que evolucionaron en el pasado y la dificultad de la duración de los experimentos de selección, probablemente no son suficientemente prolongados para atestiguar un cambio macroevolutivo o de especie (Buckling et al., 2009). No obstante, tentativas de inferir en fenómenos de especiación ha permitido acercarnos a este

fenómeno como: los experimentos a largo plazo (Lenski, 2011), especiación o radiación adaptativa (Dettman et al., 2007).

Los experimentos incluidos en este documento tratan con poblaciones en evolución. Este medio ha resultado de gran utilidad para abordar cuestiones de biología evolutiva, aunque deba recurrir a la simplificar la realidad para abordar un problemática compleja. Como expusieron Lenski y Travisano es uno de sus manuscritos (1994): “*We acknowledge the severe limitations inherent in our study of evolutionary dynamics. Foremost among these are the short time span (...) and the simple environment (which ignores the complexity and changeability of nature). The former limitation reflects our lack of access to better machines for time travel, and the latter our desire as experimentalists to keep things simple enough that we may understand the results. In terms of these limitations, we are certainly studying the tempo and mode of microevolution*”. Hay que recalcar que los estudios llevados a cabo en esta tesis son solamente aproximaciones a la realidad, ya que no contemplan la complejidad y variabilidad de las fuerzas y factores presentes en la naturaleza. Por ejemplo, la limitación temporal que en muchos casos no permite abordar la evolución por azar o enfatizar en los procesos y resultados eventuales de la evolución, recalcando la necesidad de estudios experimentales a largo plazo. Además, ignora el conjunto de los factores ecológicos implicados en la evolución al Antropoceno, las respuestas comportacionales o las interacciones entre miembros de distintas especies, circunstancias que, por otro lado, resultan demasiado complejas de reproducir en el laboratorio debido al enorme número de factores que interactúan. Continuando con este argumento, volver a reproducir la cinta de la vida (*Replaying life's tape*, metáfora de Gould), puede ser un intento ingenuo, pero ser conscientes de las limitaciones puede abrir camino a al diseño de nuevos estudios. Además, un entendimiento completo de la evolución requiere la aplicación de múltiples abordajes de manera integrada, siendo la experimentación evolutiva una herramienta esencial para probar hipótesis, que debe ser integrada con otras herramientas e interpretada con precaución. Todo diseño experimental o estudio presenta limitaciones, debemos desembarazarnos del “*Myth of Definitive Results*”(Underwood, 1998), tratar de integrar la vigencia de cada abordaje dentro de una visión conjunta y reconocer que nuestros resultados y conclusiones pese a ser vigentes, podrían llegar a no ser correctas. Perseguir ese cometido nos acerca un poco más a entender la vida y como ésta se ha desarrollado.

## ➤ El reto de la adaptación del fitoplancton al Antropoceno

*We should preserve every scrap of biodiversity as priceless while we learn to use it and come to understand what it means to humanity.*

E. O. Wilson

De una manera coloquial podemos dar la bienvenida al Antropoceno. El efecto transformador del ser humano sobre los ecosistemas presenta un patrón de rapidez y de nivel de intensidad no observado hasta el momento. Ante este escenario actual de modificaciones en los ecosistemas, la biosfera se enfrenta ante un nuevo reto medioambiental sin precedentes; el cambio global antropogénico. Dentro de este, el ser humano se presenta como la fuente de modificación afectando a las trayectorias evolutivas y acelerando el cambio evolutivo (Palumbi, 2001). En esta “evolución contemporánea”, los organismos se encuentran en una carrera acelerada hacia la adaptación a los nuevos cambios de su entorno para persistir, sin embargo con el transcurso de los futuros acontecimientos muchas especies se perderán (Leakey 1996; Norman Myers et al. 2000), el desafío está servido. La falta de adaptación conlleva la extinción. Normalmente la adaptación es un proceso lento y la tasa de extinción de fondo es baja. Pero este “zumbido” de fondo en determinados momentos se dispara causando un evento de extinción masiva que elimina una proporción significativa de la biota en el planeta en periodos de tiempos insignificantes a nivel geológico. Durante estos momentos de “pánico”<sup>22</sup> la adaptación tiene lugar de manera rápida, siendo los “triunfadores” aquellos capaces de hacer frente al cambio y prosperar.

Generalmente, los métodos convencionales para el estudio de este fenómeno global se han basado en enfoques descriptivos o eco-toxicológicos para predecir el riesgo ecológico de estas sustancias (Connon, Geist, & Werner, 2012). Además, muchos de los intentos bien-intencionados de conservación y manejo muchas veces fallan a la hora de tener en cuenta el potencial de las respuestas evolutivas rápidas que tienen lugar de forma natural (Kinnison & Haistson, 2007; Stockwell, Hendry, & Kinnison, 2003). Pero, los efectos inintencionados de la actividad humana pueden ser estudiados desde una perspectiva evolutiva en la cual la propia actividad constituye un factor selectivo cuyas consecuencias podrían ser predecibles (Swallow & Garland, 2005). La aplicación de principios evolutivos puede reducir el impacto del ser humano en la evolución (Palumbi, 2001). En el caso concreto del fitoplancton, que presenta grandes poblaciones, una amplia variación genética y fenotípica, y tiempos de renovación rápidos, hacen de sus poblaciones objeto de cambio evolutivo rápido. Estudiar el potencia de adaptación por medio de la evolución experimental es el medio directo para valorar la capacidad de adaptación del fitoplancton frente al cambio global (Reusch & Boyd, 2013).

### *El reto del incremento de la temperatura del agua*

La biogeografía global del fitoplancton está determinada por factores ambientales locales que seleccionan las especies en base a su potencial de crecimiento, siendo la temperatura un de los principales factores. La temperatura es un factor físico primario que limita la abundancia y distribución de las especies (Gaston, 2003), resultando un indicador efectivo. La influencia directa de la temperatura en las tasas de crecimiento ha

---

<sup>22</sup> Como definió Kolbert (Kolbert, 2014, pag. 16): “*The history of life thus consists of long periods of boredom interrupted occasionally by panic*”



sido ampliamente documentada en microalgas (Butterwick, Heaney, and Talling 2004; Mackey et al. 2013; Suzuki and Takahashi 1995; Singh and Singh 2015). Además, el rol de la temperatura en las dinámicas del fitoplancton se ha investigado tanto en el océano como en ambientes de agua dulce (Behrenfeld et al., 2006; Boyce, Lewis, & Worm, 2010a; Cermeño et al., 2008). Con respecto al calentamiento global, el incremento de la temperatura del agua en los últimos 20 años ha sido de 0,27°C en aguas continentales y de 0,13°C en el océano. La mayoría de los estudios sugieren que cambios en la diversidad y abundancia del fitoplancton relacionados con el incremento de la temperatura, tanto en agua dulce como en el mar (Cermeño et al., 2008; Jöhnk et al., 2008; Müren, Berglund, Samuelsson, & Andersson, 2005; O'Connor et al., 2009). Considerando que la capacidad de adaptación de una población varía en función del ambiente y que el calentamiento global presenta un patrón selectivo escalonado, resulta de interés estudiar la respuesta de las poblaciones fitoplanctónicas frente a incrementos crecientes de temperatura. En nuestros trabajos fuimos capaces de caracterizar la capacidad de adaptación frente a diferentes incrementos de temperatura de trece especies dentro del conjunto que conforma el fitoplancton.

El primer trabajo aborda la respuesta adaptativa en fitness de cinco especies (*M. aeruginosa*, *T. suecica*, *I. galbana*, *N. closterium* y *P. triestrium*), frente a diferentes temperaturas ambientales (comprendidas entre 15°C y 40°C). Las cinco especies presentaron una respuesta por medio de la aclimatación a incrementos por encima de los 20°C, lo cual concuerda con el rango anual de temperaturas de su hábitat exceptuando el caso de *I. galbana* cuya tolerancia es mucho mayor. Las tres primeras presentaron adaptación fisiológica hasta 25°C de temperatura, la variabilidad genética presente en la población permitió la adaptación hasta 30°C, y llegaron a adaptarse hasta los 35°C gracias a mutaciones espontáneas presentes a baja frecuencia en la población. Las dos últimas especies fueron capaces de adaptarse a 25°C por medio de la variabilidad genética pre-existente y hasta 30°C por medio de mutantes pre-selectivos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Huertas *et al.* (2011), que obtuvieron una adaptación de estas cinco especies por medio de un experimento de Ratchet a los mismos niveles de temperatura máximos. No hemos encontrado ningún cepa, dentro de las especies estudiadas, capaz de crecer a 40°C. Pero en el experimento de ratchet de Huertas *et al.* (2011), *Scenedesmus intermedius* fue capaz de adaptarse hasta 40°C. La adaptación a elevadas temperaturas podría estar limitada por la existencia de correlaciones entre caracteres o posibles presiones selectivas opuestas en caracteres correlacionados (Etterson et al., 2001).

El segundo estudio se llevó a cabo en doce especies marinas dentro del fitoplancton (las cuales cuatro coinciden con el primer estudio), estudiando la eficacia biológica y la proporción atribuible a la varianza genética en fitness por medio de la estimación de la heredabilidad, frente a tres niveles de presión selectiva: i) temperatura actual (temperatura de aislamiento), ii) bajos ITSM (un incremento de 2°C sobre la temperatura de aislamiento), esperados en escenarios de bajas emisiones de CO<sub>2</sub> y iii) elevados ITSM (la temperatura de aislamiento más 7°C), esperados en el escenario más desfavorable de altas emisiones de CO<sub>2</sub>. Un resultado importante de nuestro estudio es que casi todas las poblaciones naturales estudiadas parecen tener un elevado potencial de adaptación al estrés termal, presentando altas heredabilidades a la temperatura actual y frente a escenarios de bajos ITSM. La estimación de una alta heredabilidad en fitness, indica que las diferencias encontradas en la fitness de una población determinada correlacionan con las diferencias en los genotipos y no con las diferencias ambientales. La heredabilidad no señala las causas de las diferencias entre fenotipos solo indica correlaciones. Muchas especies muestran un elevado potencial para adaptarse a presiones

de elevados ITSM mostrando heredabilidades por encima de 0,5. Esto ocurre en las poblaciones de especies costeras de diatomeas (*C. curvisteus*, *S. costatum*), clorofitas (*T. suecica*) y dinoflagelados (*P. micans*, *A. minutum*), así como en las dos especies oceánicas de haptofitas estudiadas (*P. polylepis*, *I. galbana*). En el caso de *O. luteus*, la estimación de la heredabilidad frente a elevados ITSM fue de en torno a 0,41. En cambio, *P. marinus* y *N. closterium*, prestaron una heredabilidad media, entre 0,5 y 0,25, ya bajo escenarios de bajos ITSM, y frente a escenarios elevados ITSM, presentan una heredabilidad baja ( $\leq 0,25$ ) junto con las especies *P. triestinum* y *S. trochoidea*. Una heredabilidad baja señala que la varianza fenotípica en fitness se debe a diferencias en el entorno, las diferencias genéticas de esa población concreta apenas contribuyen.

En las cuatro especies que presentan baja heredabilidad en escenarios elevados de ITSM, el número de cepas (genotipos) que sobreviven cae significativamente. De hecho, *N. closterium* no presenta variabilidad genética en fitness en las condiciones del experimento en escenarios elevados de ITSM, sobreviviendo únicamente una cepa (genotipo) de las 14 estudiadas. Los valores medios de fitness obtenidos varían significativamente entre especies, siendo *T. suecica* e *I. galbana* las especies que presentan valores de fitness más altos (en torno a 0,8-0,7) y, *S. trochoidea*, *O. luteus*, *P. marinus* y los dos ecotipos de *P. micans*, fueron las especies que presentaron los valores más bajos en fitness (en torno a 0,3). Un resultado a tomar en consideración es los valores medios de la fitness frente a un escenario de bajos ITSM no se ven significativamente afectados en ninguna de las especies, en cambio sí se ven significativamente reducidos en el escenario de elevados ITSM en las especies *P. marinus*, *P. triestinum*, *S. trochoidea*, *N. closterium* y ambos ecotipos de la especie *S. costatum*.

La tasa de calentamiento global actual entorpece la adaptación como estrategia de subsistencia en numerosos organismos (Bell & Collins, 2008; Gienapp, Teplitsky, Alho, Mills, & Merilä, 2008; Hoegh-Guldberg, 1999; Visser, 2008). Dentro de las estrategias de adaptación, desde una perspectiva amplia, el fitoplancton pueden responder de diferentes formas al calentamiento global: mediante el desplazamiento a ambientes menos hostiles, o mediante la adaptación mediada por una respuesta fisiológica o genética. La mayoría de las especies fitoplanctónicas, aunque presentan estrategias de desplazamiento (p. ej. natación activa mediante flagelos de *Chlamydomonas sp.* o la regulación de la flotabilidad en Cianobacterias), son principalmente especies a la deriva. Su reducida capacidad de migración, hace esencial predecir la capacidad de aclimatación y adaptación genética de las diferentes especies: conocer qué grado de “elasticidad” fisiológica, fenotípica y genética presentan para acomodarse a las tasas de calentamiento global previstas. Estos resultados revelan que las poblaciones fitoplanctónicas presentan suficiente variabilidad genética para el carácter fitness frente a leves ITSM dentro de las poblaciones, asegurando la adaptación a un aumento moderado de temperatura. Empero, ante escenarios menos optimistas, muchas especies ven muy reducida su capacidad de adaptación como es el caso de *N. closterium*. Además, cinco especies presentaron una reducción importante en fitness y la consiguiente reducción demográfica que puede comprometer la persistencia.

Nuestros estudios revelan diferencias inter-específicas claras en la capacidad de adaptación a diferentes intensidades de temperatura, sin relación directa con el hábitat o el grupo funcional. Las tendencias generales descritas sugieren, que en la naturaleza, el calentamiento del agua favorece a las clases más pequeñas (Daufresne, Lengfellner, & Sommer, 2009; Morán, López-Urrutia, Calvo-Díaz, & Li, 2010), pero nuestros resultados indican una buena respuesta adaptativa por parte de *M. aeruginosa* y en *P. polylepis*, y un bajo potencial por parte de *P. marinus*. Por consiguiente, según sugieren nuestros

resultados no se cumple esta tendencia en todas las especies. Por otro lado, el hecho de que las especies formadoras de blooms sean capaces de adaptarse genéticamente a incrementos de la temperatura, como es el caso de *M. aeruginosa* y el dinoflagelado *P. triestinum* formador de mareas rojas, concuerda con las características de preferencia en las cuales tienen lugar sus proliferaciones en ambientes naturales, y con los modelos que sugieren que el incremento de la temperatura favorece este tipo de proliferaciones (Jöhnk et al., 2008), con las serias implicaciones ecológicas que pueden acarrear el futuro. Los resultados de la estimación de la variabilidad genética y frente a temperatura concuerdan en las cuatro especies que se solapan en ambos estudios, siendo las especies menos pre-adaptadas *N. closterium* y *P. triestrium*. En relación al nicho ecológico y la capacidad de adaptación a la temperatura de las diferentes especies, no observamos una relación clara que pueda indicar adaptación en el pasado a temperaturas más elevadas debido a las variaciones naturales. Thomas et al. (2012) tampoco observaron una correlación entre el nicho ecológico y la capacidad de adaptación a la temperatura. Por el contrario, Boyd et al. (2013) sí que observaron una relación entre la temperatura de saturación y el rango de temperaturas anual del hábitat de preferencia.

Comparativamente con otros estudios los resultados concuerdan. Huertas et al. (2011) presentan resultados concordantes con nuestros estudios de análisis de fluctuación, con respecto a la máxima capacidad de adaptación obtenidos mediante el experimento de ratchet. Renaud et al. (1995), en su trabajo relacionaron la temperatura con la tasa de crecimiento, caracterizando a *N. closterium* como una especie que presenta una tolerancia limitada a la temperatura e *Isochrysis sp.* como la más tolerante con tasas de crecimiento mucho mayores. Boyd et al. (2013) por medio del estudio de otras especies de fitoplancton marino, también detectaron una elevada variabilidad con respecto a la tolerancia a la temperatura en función de la especie. La concordancia en los resultados por medio de la utilización de diferentes procedimientos para estimar la capacidad de adaptación confiere fiabilidad a estas predicciones.

No obstante, hay que tener en cuenta que estos estudios no abordan otros procesos que pueden influir en la persistencia frente al ITSM. Desde el punto de vista de la genética de poblaciones clásica, la recombinación debería tenerse en cuenta como fuente de variabilidad. O por ejemplo, en algunos dinoflagelados se ha evidenciado que presentan un “reloj” endógeno circanual que podría regular la germinación de los quistes y asegurar que las formas vegetativas solo se enfrenten a condiciones ambientales favorables, siendo una estrategia regulación frente al incremento de temperatura (Anderson and Keafer 1987; Yentsch and Mague 1980; Costas and Varela 1988). Tampoco se tienen en cuenta otras dinámicas, como el efecto del incremento de la temperatura reforzando el papel de los consumidores (como el zooplancton) en la red trófica, reduciendo el total de la biomasa (Lewandowska, Hillebrand, Lengfellner, & Sommer, 2014; O'Connor et al., 2009). Considerando además otras presiones antropogénicas (p. ej. la eutrofización, alteraciones de la irradiación, la acidificación...), complica de manera exponencial llevar a cabo predicciones sobre la respuesta al cambio ambiental del conjunto de las poblaciones naturales del fitoplancton. Aunque quedan muchas incertidumbres con respecto a la respuesta del fitoplancton frente al incremento de temperatura, está claro que existe adaptación diferencial entre especies con respecto a su capacidad de adaptación a la temperatura

Por lo tanto, el incremento de temperatura global va a influenciar de manera directa a las comunidades fitoplanctónicas. Si la actual tendencia de liberación de CO<sub>2</sub> y otros gases de efecto invernadero a la atmósfera se mantiene, para finales del siglo XXI se han hipotetizado diferentes escenarios de ITSM (IPCC, 2007), con incrementos

estimados de entre 1,1-6,4°C en función del escenario (Meehl et al., 2007). Teniendo en cuenta que la adaptación tiene lugar en un ambiente determinado, resulta de interés conocer la en el caso concreto del calentamiento climático global que presenta un patrón selectivo escalonado. Conocer la variabilidad de las poblaciones frente a los posibles escenarios de incremento de temperatura previstos permite hacer predicciones a futuro de la evolución de las comunidades. El planeta y algunas zonas de los océanos podrían calentarse más que en ningún otro momentos en el último Ma (Belkin, 2009; Hansen, Sato, Ruedy, & Lo, 2006). El incremento de la temperatura puede inducir un reemplazamiento progresivo hacia genotipos con mayor tolerancia a la temperatura cuyo impacto escalado hacia niveles tróficos superiores, resulta en este momento inescrutable. Por lo tanto, es necesario seguir realizando estudios sobre la adaptabilidad a la temperatura por parte del fitoplancton para poder formular predicciones fiables.

#### *Adaptación al cambio brusco.*

El fitoplancton, como conjunto, indudablemente puede resistir múltiples presiones ambientales presentando una gran capacidad de adaptación. No en vano, las cianobacterias llevan existiendo en la Tierra más de 3000 Ma (Schopf and Packer 1987) y los eucariotas fotosintéticos primigenios aproximadamente 1500 Ma (Knoll 1992), persistiendo a los cambios que han devenido a lo largo de la historia de la Tierra (Rasmussen, Fletcher, Brocks, & Kilburn, 2008). Actualmente, se enfrentan a un cambio global sin precedentes, frente al cual muchas comunidades se van reestructurar y muchas especies se van a extinguir en el proceso. La clave para entender cómo se comportan las comunidades y especies frente al cambio global, radica en entender los mecanismos que permiten la adaptación y el ER, especialmente frente a presiones selectivas intensas que conlleven una reducción demográfica fuerte.

Por medio del experimento clásico de Análisis de Fluctuación (Luria and Delbrück 1943), en medios líquidos (Lopez-Rodas et al., 2001), hemos evaluado cual el mecanismo evolutivo que permite a la poblaciones fitoplanctónicas adaptarse a un cambio ambiental abrupto que conlleva una reducción drástica de la población, siempre y cuando la adaptación llegue a tener lugar. Este tipo de experimento evalúa la capacidad de adaptación genética, concretamente mediada por mutaciones beneficiosas que tienen lugar por azar. El Análisis de Fluctuación ha sido ampliamente utilizado para valorar la capacidad de adaptación rápida de numerosas especies dentro del fitoplancton frente a presiones selectivas intensas. Capitalizando este diseño experimental, por un lado analizamos la capacidad de adaptación de diferentes especies a presiones selectivas únicas, frente a un único factor, concretamente, metales como el osmio y berilio, y diferentes intensidades de temperatura o, frente a un conjunto de factores selectivos, como ambiente extremos de minería de uranio. Todos los agentes selectivos se aplicaron a dosis o niveles en los que la toxicidad ejercía una presión extrema sobre las especies estudiadas, reduciendo drásticamente la población. Parece evidente que ante una reducción demográfica intensa, teniendo en cuenta que las mutaciones son la fuente última de variación, solamente una mutación beneficiosa puede evitar la catástrofe. El experimento plantea dos hipótesis: que las mutaciones pueden ser preselectivas, presentes por azar en la población a baja frecuencia, o postselectivas, inducidas por la exposición al agente selectivo. En todas las especies estudiadas en esta tesis y los trabajos revisados, cuando hubo adaptación tuvo lugar por mutaciones pre-existentes en las poblaciones. Sin duda, con este tipo de experimento, no podemos descartar la aparición de alguna mutación post-selectiva después de la exposición al agente selectivo, pero hasta el momento no hay evidencias de que pudieran producirse. Pero no influyen en la conclusión principal: el rescate evolutivo frente al cambio ambiental brusco, si tiene lugar, es en primera instancia



## VII.-Discusión

gracias a genotipos mutados presentes en la población. Previsiblemente, en algunos casos de estudio no tuvo lugar la adaptación. Tal es el caso del *M. aeruginosa* y *E. huxleyi* al osmio, y a intensidades de temperatura  $\geq 35^{\circ}\text{C}$  en las cinco especies estudiadas por medio del Análisis de fluctuación.

El experimento de Luria y Delbrück permite estimar la tasa de mutación ( $\mu$ ) de la población estudiada frente al agente selectivo. Dentro de los estudios de análisis de fluctuación realizados previamente en el fitoplancton a diferentes presiones selectivas, la tasa de mutación varía entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  mutaciones por generación, encontrándose todas las tasas analizadas en esta tesis dentro de este rango de magnitud. El rango de magnitud es amplio teniendo en cuenta que se trata de diferentes especies y agentes selectivos. Hay que entender que esta tasa se basa en la aparición de una mutación que confiera resistencia frente a un agente selectivo, por lo que la diana pueden ser diferentes genes dando resultados diferentes dentro de la misma especie. Comparativamente con otros microorganismos, en bacterias se ha calculado que las mutaciones espontáneas tienen lugar a una tasa de aproximadamente  $10^{-3}$  por división celular (Lee et al. 2012). Sin embargo, otros organismos unicelulares como bacterias y levaduras presentando tasas más bajas, de órdenes entre  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ , para mutaciones beneficiosas (Drake, Charlesworth, Charlesworth, & Crow, 1998). Pese a presentar menores magnitudes de mutación, las bacterias y los hongos al presentar tasas de replicación mayores que el fitoplancton, lo cual resulta en una tasas de cambio evolutivo mayor de las poblaciones. Hay que tener en cuenta que los caculos para la tasas de mutación están estrechamente ligado al número de réplicas, por lo tanto si el modelo experimental no tiene un número adecuado de réplicas, este puede presentar sesgos (Foster 2006).

Adicionalmente, mediante este tipo de estudios podemos comparar los genotipos evolucionados frente a los ancestrales y evaluar el coste de la adaptación. La adaptación a un nuevo ambiente suele conllevar un coste, bien porque la selección ha fijado genes beneficiosos para un ambiente que son deletéreos para otros (p. ej. las líneas de *E. coli* adaptadas a glucosa (Travisano & Lenski, 1996)), o por la acumulación de mutaciones neutrales en un ambiente que resultan deletéreas en otros (p. ej. la adaptación a condiciones luz en *Chlamydomonas sp.* (Reboud & Graham, 1997)). Aunque el coste de la adaptación puede ser poco evidente en algunos casos, resulta improbable que los mismos genes resulten beneficiosos bajo condiciones considerablemente distintas, por lo tanto el coste la adaptación debería resultar más evidente a medida que las condiciones divergen. Desde un punto de vista tradicional, frente a un cambio ambiental brusco, el genotipo promedio cuya fitness es mayor, se ve desplazado por el mutante cuya mutación resulta beneficiosa en este nuevo ambiente, pudiéndose afirmar que el conjunto de población se aleja de su fitness óptima (Gonzalez and Bell 2012). Estudiar el coste asociado, que aleja a las poblaciones de su fitness óptima, resulta interesándote para detectar dinámicas poblacionales. El coste asociado de las mutaciones, puede inicialmente reducir la fitness del conjunto poblacional, pero por efecto del proceso selectivo, este efecto se puede reducir por medio de adaptaciones compensatorias (Levin, Perrot, & Walker, 2000). De este modo con el tiempo aumenta la eficacia de las poblaciones resistentes si estas se encuentran bajo la presión selectiva constante, p.ej. un incremento mantenido de la temperatura (Björkman et al., 2000). En nuestros estudios, todos los fenotipos adaptados comparativamente presentan una fitness menor que los ancestrales. Particularmente en el estudio de la adaptación al berilio, se llevó a cabo una valoración comparativa de la actividad fotosintética y morfológica. La Y(II) era significativamente en mayor en la cepa ancestral (un 15% mayor), que en la cepa resistente. Sin embargo ante un régimen selectivo frente a diferentes concentraciones de

berilio la cepa resistente no mostró una inhibición detectable a diferencia de la cepa sensible, que presentó una fuerte inhibición del Y (II) en función de la dosis a partir de las 12 horas de exposición. A nivel fenotípico encontramos que la cepa resistente comparativamente presentaba menor tamaño, y un mayor número de mitocondrias y cloroplastos. Esto indica que la adaptación al berilio conlleva no solo un efecto sobre el crecimiento y una reducción de la eficacia fotosintética, además de modificaciones a nivel del fenotipo. Los cambios descritos a múltiples niveles (fenotípico, fotosintético, de fitness,...) sugieren que la adaptación dio lugar a cambios extensos podrían ser compatibles con un efecto pleiotrópico de la mutación.

La capacidad de adaptación del fitoplancton viene determinada por la intensidad de la presión selectiva, presentando diferencias en los mecanismos que contribuyen a la adaptación. En el caso de organismos con elevadas tasas de replicación (como es el caso del fitoplancton) y bajo presiones selectivas intensas, cuando el resultado del producto - tamaño de la población por su tasa de mutación- es grande, el paso limitante en la adaptación es la demora de tiempo hasta que las mutaciones beneficiosas existentes se propaguen en la población (Wahl & Krakauer, 2000). Los trabajos de adaptación rápida a ambientes y presiones selectivas extremas evidencian la posibilidad de evolución adaptativa en el fitoplancton. Estos trabajos secundan la idea de que la evolución puede llegar a ser suficientemente rápida para permitir a las poblaciones fitoplanctónicas recuperarse del declive demográfico provocado por el cambio ambiental y evitar la extinción, dando lugar a un rescate evolutivo (Gonzalez et al. 2013).

El experimento de Análisis de Fluctuación originalmente ideado para identificar el origen de la adaptación, al tratarse de un estudio multi-generacional, nos permite analizar el efecto de una exposición única frente a uno o un conjunto de estresantes, y examinar la repercusión de la exposición de la generación parental sobre las siguientes generaciones. Teniendo en cuenta que la mayoría del fitoplancton es unicelular y haploide, los cambios heredables en las células parentales inducidos por el efecto tóxico potencialmente van a ser transferidos a la siguiente generación. Este tipo de experimentos se presentan como una herramienta para predecir los efectos de los estresantes ambientales dentro de esquema actual de ERA, que busca integrar diferentes abordajes, examinar consecuencias a largo plazo y trayectorias evolutivas (Ahlers, Stock, & Werschkun, 2008; Bednarska et al., 2013; Bradbury, Feijtel, & Leeuwen, 2004; Forbes et al., 2011).

#### *Ambientes extremos de acción humana.*

Un claro ejemplo de adaptación rápida a ambientes altamente selectivos son los ambientes extremos generados por el hombre. Estos ambientes sirven de laboratorios naturales para estudiar la evolución a múltiples agentes selectivos a diferentes niveles de presión selectiva, generados por el hombre. No es de extrañar encontrar organismos prosperando en estos ambientes extremos antropogénicos, considerando la cantidad de organismos extremófilos identificados en ambientes extremos naturales (Rothschild & Mancinelli, 2001). Por ejemplo, en los manantiales termales alcalinos, en el Parque Natural de Yellowstone, Estados Unidos o las aguas termales y ácidas de Vulcano, en Italia. En particular, hemos estudiado la adaptación a dos ambientes extremos de minería de uranio con alto contenido en metales y pH bajo, para poder entender la diversidad natural encontrada en las charcas y la supervivencia de microalgas mesófilas a diferentes presiones selectivas. Las dos charcas estudiadas en profundidad (charcas de Saelices y Villavieja), presentaron una diversidad muy baja de especies fitoplanctónicas, ambas presentaban tres especies de clorofitas y una diatomea en la charca de Saelices.

Parece razonable no encontrar cianobacterias pese a ser un grupo cosmopolita, debido a la elevada acidez de las aguas. Sin embargo, hay una gran diversidad de bacterias.

Aparentemente la adaptación a este tipo de ambientes extremos no parece un proceso sencillo, puesto que solo un número reducido de especies de fitoplancton han sido capaz de adaptarse y prosperar. La toxicidad de ambas charcas para las clorofitas resultó ser muy elevada, obtuvimos una inhibición total del crecimiento y de la actividad fotosintética tanto en *C. reinhardtii*, como en *D. chlorelloides*. Llevamos a cabo el estudio de toxicidad en estas especies puesto que ambas pertenecen a los mismos géneros de las especies identificadas en las charcas. En contraposición a la idea de que la adaptación tiene lugar a lo largo de periodos de tiempo dilatados y por efecto de mutaciones graduales de pequeño efecto, la adaptación a este tipo de ambiente extremos ha tenido lugar rápidamente considerando que la actividad minera comenzó en 1960. Pese a las múltiples presiones selectivas en estos ambientes, el resultado de los experimentos análisis de fluctuación determinó que la adaptación es inmediata debido a la presencia de genotipos mutantes pre-existentes, en ambas especies expuestas a las aguas de Saelices. No obstante, en el caso del agua procedente de Villavieja, ambas especies fueron incapaces de adaptarse. La incapacidad para adaptarse indica que la variabilidad genética generada por las mutaciones que surgen al azar por medio de la expansión clonal, no es suficiente para garantizar la adaptación en un ambiente selectivo como la charca de Villavieja. Estos resultados concuerdan con otros trabajos de adaptación a ambientes extremos, tanto naturales como por acción humana, que han demostrado que las clorofitas son capaces de adaptarse rápidamente a la mayoría de los ambientes extremos, aunque no a todos. Por mencionar algunos: aguas ácidas y con metales como Río Tinto (Costas et al., 2007), aguas geotermales (Costas, Flores-Moya, & López-Rodas, 2008a) o sulfurosas (Victoria López-Rodas, Rouco, Sánchez-Fortún, Flores-Moya, & Costas, 2011).

En el caso concreto de la charca de Villavieja, ambiente frente al cual no hubo adaptación mediada por mutantes pre-existentes, la recombinación genética permitió la adaptación de *C. reinhardtii*. Por lo tanto, podemos inferir que la adaptación a Villavieja puede estar mediada por la variabilidad generada durante la reproducción sexual. Los tres géneros descritos en esta charca solo *C. reinhardtii* presentan reproducción sexual evidente, en el caso de los géneros *Scenedesmus* y *Dictyosphaerium* ha sido descrita reproducción sexual en la naturaleza o en laboratorio en algunas especies, no siendo muy común (John & Tsarenko, 2002; Trainor, 1996). Este resultado sugiere que para adaptarse a Villavieja son necesarias al menos dos mutaciones. Teniendo en cuenta la baja tasa mutación para Saelices (del orden de  $10^{-7}$  en *C. reinhardtii*) y el número total de células ( $10^5$ ), la probabilidad de que ocurran en una misma célula es muy baja. La recombinación puede generar nueva variabilidad o permitir que dos mutaciones presentes inicialmente en diferentes células se combinen en la descendencia. La reproducción sexual por tanto en nuestro ambiente debe comportar ventajas adaptativas, la recombinación genética. La reproducción sexual, sin duda es un suceso poco frecuente en estos organismos. Nuestros resultados concuerdan con numerosos estudios que han concluido que el sexo favorece una adaptación más rápida cuando las poblaciones son grandes y se encuentran mal-adaptadas a su ambiente (Colegrave 2002; Goddard, Godfray, and Burt 2005). La reproducción sexual es uno de los procesos de reproducción más comunes en eucariotas y por medio de la recombinación amplifica el número de genotipos posibles. Las ventajas evolutivas de la reproducción sexual se han atribuido tanto para la adaptación en entornos cambiantes como para la reducción de mutaciones deletéreas (Kondrashov, 1988; Muller, 1964).

### *La adaptación diferencial*

El parámetro de diversidad llega a su máxima expresión en las comunidades fitoplanctónicas (grupo polifilético compuesto por once filos (Margulis & Schwartz, 1982)), no en vano, la espectacular diversidad del fitoplancton se enmarca en la llamada “paradoja del plancton” (Fox, Nelson, and Mccauley 2010; Hutchinson 1961). La coexistencia de las especies del fitoplancton parece no estar regida por el principio de exclusión competitivo, siendo el supuesto más aceptado el que atribuye este desequilibrio a las fluctuaciones hidrológicas y físico-químicas (Scheffer, Rinaldi, Huisman, & Weissing, 2003). En la actualidad, se han descrito numerosos cambios en la biogeografía de las especies que componen las comunidades fitoplanctónicas y resulta difícil atribuir estos cambios directamente a variaciones concretas de temperatura, variaciones en los nutrientes, la luz u otros factores bióticos o abióticos (Finkel et al., 2010; O’Connor et al., 2009). Este desequilibrio *equilibrado* que permite a las comunidades fitoplanctónicas presentar alta diversidad pese a las limitaciones de recursos, puede verse amenazado frente al escenario actual de cambio global. Un ejemplo extremo de reducción de la diversidad, sería el caso de los ambientes extremos de minería presentes en esta Tesis donde parece actuar el principio de exclusión competitiva y tres especies dominan las poblaciones *Chlamydomonas sp*, *Dictyosphaerium sp* y *Scenedesmus sp*.

Cuando los límites normales de las condiciones ambientales cambian, las especies presentan diferencias en su capacidad de adaptación, las especies con mayor tolerancia o adaptabilidad se verán favorecidos, mientras que los más sensibles serán excluidos. Estos mecanismos incrementan la tolerancia de la comunidad a costa de alterar su propia estructura, existiendo diferentes presiones selectivas dentro de la diversidad de la comunidad (Fogg, 2001). Las diferencias taxonómicas, de tasas de crecimiento, hábitat de origen, entre otras, están implicadas en las diferencias entre grupos para adaptarse al estrés ambiental (Huertas et al. 2011; Huertas et al. 2010). Profundizando en la adaptación diferencial, los resultados obtenidos en esta memoria determinan que las clorofitas continentales son el grupo que presentan mayor tolerancia dentro de los ecosistemas de agua dulce: *D. chlorelloides* fue capaz de adaptarse a niveles de contaminación elevados de osmio y *C. reinhardtii* al berilio, estando ambas presentes en los ambientes extremos de Saelices y siendo capaces de adaptarse rápidamente a los mismos. Dentro de las especies cosmopolitas en agua dulce, las más comunes pertenecen a los grupos de las clorofitas y las cianobacterias, sin embargo *M. aeruginosa* no fue capaz de adaptarse a la contaminación por osmio, ni estaba presente en los ambientes extremos estudiados. Esto concuerda con otros estudios que demuestran que se ven más afectadas por metales pesados que las especies eucariotas (Hadjoudja, Vignoles, Deluchat, & Lenain, 2009; Takamura, Kasai, & Watanabe, 1989; Zhou, Juneau, & Qiu, 2006). Además, en numerosos estudios de ambientes extremos en los cuales la acidez era muy alta (pH inferior a 4), no se ha observado la presencia de cianobacterias, siendo el único caso encontrado en lagos ácidos en Alemania, donde cianobacterias filamentosas presentan tolerancia a la acidez (Steinberg, Schäfer, and Beisker 1998). A este respecto, se ha sugerido en picocianobacterias marinas que esta menor resistencia se deba a su pequeño tamaño, especialmente a la mayor dificultad que supone mantener el pH intracelular (Jasser, Karnkowska-Ishikawa, & Chróst, 2013), otros sugieren que están relacionados con la pared (Huang, Kolodny, Redfearn, & Allen, 2002; Kallas & Castenholz, 1982). Pese a la aparente sensibilidad a la acidez de las cianobacterias, son un grupo ubicuo capaz de soportar altas temperaturas, salinidades y sequías (Fogg, 2001; Wihelm, 2002). Nuestros resultados apoyan otros previos con respecto a *M. aeruginosa*, las altas temperaturas favorecen la proliferación de las cianobacterias. Esta proliferación presenta



## VII.-Discusión

una relación directa con el incremento de los HABs en los lagos eutróficos (Joehnk, Huisman, & Sharples, 2008).

En el caso de las especies de microalgas marinas, nuestros resultados presentan una adaptación diferencial dentro de los grupos taxonómicos y dentro del hábitat de preferencia, sugiriendo que la capacidad de adaptación a la temperatura está más relacionada con la especie *per se*. Además, en las dos especies en las cuales se estudiaron diferentes ecotipos (*P. micans* y *S. costatum*), las poblaciones presentaron una variabilidad genética similar frente a diferentes ITSM. En cuanto a los dinoflagelados estudiados formadores de mareas rojas, su hábitat de preferencia se relaciona con temperaturas más altas y proliferaciones en la época estival (Anderson, 1989; Hernández-Becerril, Cortés Altamirano, & Alonso, 2000). Además se ha sugerido que los dinoflagelados prefieren temperaturas más altas, que puede ser un reflejo de la mixotrofismo y la influencia de la temperatura en el metabolismo heterotrófico o la movilidad flagelar (Finkel et al., 2010; Stoecker, Hansen, Caron, & Mitra, 2017). Curiosamente, los dinoflagelados *P. triestium* y *S. trochoidea*, presentaron una heredabilidad y una fitness más baja dentro de este grupo taxonómico a elevados ITSM, pero *P. triestium* fue capaz de adaptarse genéticamente a 30°C como indican estudios previos (Huertas et al. 2011).

Tanto las clorofitas, como las haptofitas estudiadas presentaron mucha variabilidad pre-existente y capacidad de adaptarse hasta 35°C de temperatura. Además, *T. suecica* fue capaz de adaptarse a dosis elevadas de osmio, siendo el único ejemplo dentro de estos dos taxones que presentó incapacidad para adaptarse que fue el cocolitóforo *E. huxleyi* (no hubo adaptación al osmio). Las diferencias en la tolerancia dentro del grupo de las haptofitas sugiere que los procesos de calcificación están fuertemente influenciados por factores externos (p. e. temperatura (Sorrosa, Satoh, & Shiraiwa, 2005) o la acidificación (Jones et al. 2013)). Entre las diatomeas, *N. closterium* presenta muy baja variabilidad genética a la temperatura, pese a ser considerada una especie generalista (Cloern & Dufford, 2005), en contraste con las demás diatomeas estudiadas, aunque fue capaz de adaptarse a 30°C. En relación al hábitat, dentro del grupo oceánico estudiados las cianobacterias marinas presentan menor variabilidad que las haptofitas con respecto a la temperatura. En el caso de las aguas costeras, todos los taxones presentan especies más o menos pre-adaptadas a la temperatura, siendo *N. closterium* la peor adaptada.

Los resultados revelan, dentro del terreno de la adaptación, diferencias inter-específicas claras entre las especies. Como resultado, el cambio global va a reportar una reestructuración de los ecosistemas en función de la tolerancia de las especies, que se traduce en cambios en las distribuciones, alteraciones de la sucesión espacial y temporal y una reducción de la diversidad (Hughes, 2000; Litchman, Klausmeier, Miller, Schofield, & Falkowski, 2006). El hecho de que algunas especies presenten una tolerancia mayor o sean capaces de adaptarse genéticamente puede acarrear serias implicaciones ecológicas en el futuro, por ejemplo en relación a la tolerancia y adaptación a la temperatura de *M. aeruginosa* y los dinoflagelados formadores de mareas rojas. Las floraciones pueden estar compuestas por organismos que producen toxinas presentar toxinas o dar lugar a episodios anóxicos. La modificación de las comunidades fitoplanctónicas o la pérdida de diversidad pueden alterar patrones globales de nutrientes, la red trófica y la producción primaria neta de los ecosistemas acuáticos y pueden poner en riesgo la capacidad de carga de los ecosistemas acuáticos. Por ejemplo, ante una reducción drástica de las poblaciones fitoplanctónicas, ¿seguirá el océano actuando como sumidero de CO<sub>2</sub>? o ¿qué repercusiones puede tener sobre el futuro de las pesquerías?

➤ **Rebobinado el *cassette* de la vida, acercamiento a una transición**

“Rewind and replay the tape of life again and again, as the now familiar argument goes, and there is no predicting (or reproducing) the outcomes. Roses and redwoods, humans and hummingbirds, trilobites and dinosaurs each owe their existence (or demise) to unfathomable combinations of innumerable rolls of the ecological and genetic dice”

(Carroll, 2001)

¿Si la cinta de la vida fuera rebobinada, obtendríamos organismos similares a los actuales? La respuesta clásica sería una negativa rotunda<sup>23</sup>, es una cuestión teórica. Pero, en los últimos años, los conocimientos en genética y evolución están desafiando, en parte, este punto de vista (Orgogozo, 2015). Algunos estudios de evolución experimental han permitido testar la repetibilidad de la evolución en los microorganismos y sugieren un número limitado de trayectorias evolutivas (Fragata et al., 2014; Gresham et al., 2008; Tenaillon et al., 2012). Aunque todos los experimentos presentan limitaciones temporales o de azar (como las mutaciones y la recombinación), podemos hacer un acercamiento para identificar si existen algunas condiciones limitaciones o fuerzas que han dado forma a procesos evolutivos complejos como el salto a la multicelularidad. Puede que en algunos eventos que ocurrieron una o pocas veces en la historia pueda resultar imposible replicarlos (Vermeij, 2006), pero parece una empresa abordable teniendo en cuenta algunas proezas que se consideraban inalcanzables como la multicelularidad (Ratcliff et al., 2012) o la síntesis de pirimidina activa en condiciones prebióticas plausibles (Powner, Gerland, & Sutherland, 2009). En nuestro estudio evolución experimental en relación al origen de la multicelularidad con la levadura *S. cerevisiae*, llevamos a cabo dos experimentos evaluando las posibles implicaciones de las diferencias ecológicas en esta transición. Nuestra hipótesis de partida planteaba que no íbamos a obtener el fenotipo *snowflake yeast* bajo condiciones de restricción nutricional, en relación al coste asociado al tamaño y posibles problemas de difusión en un medio con pocos recursos.

En el primer experimento, partiendo de un fenotipo unicelular clónico, propagamos cinco sets bajo diferentes condiciones selectivas y nutricionales. Los dos sets (Set 1 y Set 4) que actuaban de control, sin selección por sedimentación (NS) uno en medio rico (RM) y otro en medio mínimo (MM), mantuvieron el fenotipo ancestral (unicelular) a lo largo del experimento. En el caso del Set 2 propagado en RM y mediante selección por sedimentación (SS), que actuaba como control positivo en base a experimento original de Ratcliff *et al.* (2012), obtuvimos al final de experimento racimos multicelulares de levaduras semejantes a copos de nieve como los fenotipos *snowflake yeast* previamente descritos, en todos los replicados siendo el fenotipo mayoritario. En oposición a nuestra hipótesis de partida, el Set 3 (MM y SS) y el Set 5 (conmutado de MM a RM a los 40 días bajo SS), obtuvimos fenotipos multicelulares *snowflake yeast* en la mayoría de los replicados. Aunque no todos los replicados llegaron a desarrollar el fenotipo multicelular, obtuvimos el mismo fenotipo *snowflake yeast*, en condiciones restrictivas (MM), conmutadas (MM a RM) y no restrictivas (RM), lo cual indica un convergencia en los fenotipos obtenidos. La levadura *S. cerevisiae* se considera de un

---

<sup>23</sup> Stephen Jay Gould al proponer un experimento que rebobinara la cinta de la vida afirmó: “*The bad news is that we can’t possibly perform the experiment*”, pp. 48, en su libro, *Wonderful Life: The Burgess Shale and the Nature of History* (Gould 1989).

organismo unicelular en la naturaleza, pese a que se ha descrito la formación de clusters o conglomerados, o la floculación relacionada con la falta de alimento. En el caso del fenotipo *snowflake yeast*, pese a que probablemente ha sido observado previamente, el primer estudio sistemático fue realizado por Ratcliff *et al.* (2012), sugiriendo la necesidad de una fuerte presión selectiva mantenida para inducir la selección de estos fenotipos. En el caso de estudios similares con otros organismos, como en *C. reinhardtii*, la selección por sedimentación también resultó en la evolución de un fenotipo multicelular tipo racimo (Ratcliff *et al.*, 2013). Lo cual concuerda con lo sugerido por Niklas y Newman (2013), los cuales consideran que diferentes clados pueden haber compartido herramientas similares o análogas en relación a una fuerza física, resultando en estructuras funcionales análogas que exhiben los ancestros. Pese a no presentarse en algunos replicados del Set 3 y Set 5, podríamos decir que bajo presiones selectivas idénticas la evolución hacia el fenotipo *snowflake yeast* no está restringida por la limitación de nutrientes.

Las diferencias significativas encontradas en todas las medidas de dispersión entre sets (MM, RM y Ambos MM y RM), sugieren una influencia del ambiente. Las diferencias ambientales con respecto al medio de cultivo resultaron en una divergencia en el patrón evolutivo. En el caso del Set 2 (RM y SS) todos los cultivos presentaron una predominancia del fenotipo multicelular, como en el experimento original de Ratcliff *et al.* (2015). Sin embargo, en el Set 3, el fenotipo *snowflake yeast* no llegó a presentarse en cuatro de los diez replicados y presentó una gran variabilidad entre replicados, presentando poblaciones con únicamente fenotipos multicelulares, poblaciones mixtas y poblaciones que mantienen el fenotipo ancestral. En el caso del Set 5 (conmutado de MM a RM), los resultados fenotípicos de las poblaciones presentan una tendencia hacia la predominancia del fenotipo multicelular, pero también presentaron distribuciones fenotípicas diferentes entre los replicados. Este resultado sugiere que pese a que la restricción nutricional no impide la selección del fenotipo *snowflake yeast*, pero la persistencia de fenotipos unicelulares en algunos cultivos sugiere un coste asociado a las condiciones nutricionales.

Los organismos multicelulares evolucionaron hace millones de años y muchas formas de transición se han perdido a lo largo de proceso evolutivo<sup>24</sup>, resultando difícil identificar los “primeros” fenotipos. En nuestro caso, hemos elegido una presión selectiva basándonos en experimentos previos que evolucionaron hacia la multicelularidad, reconociendo que puede ser incorrecta y que los posibles procesos selectivos que dieron lugar a esta transición evolutiva pueden tener relación con procesos, como la selección de formas agregativas como los biofilms. Sin embargo, buscábamos estudiar si la restricción nutricional condicionaba el salto hacia la multicelularidad, y en nuestro sistema, la restricción nutricional no supone una limitación. Teniendo en cuenta que Ratcliff *et al.* (2015) identificaron la mutación que impediría la completa separación celular que da lugar al fenotipo *snowflake*, o que se han identificado mutaciones en bacterias que incrementan la producción de matriz extracelular formado clusters (p. ej. en *Pseudomonas fluorescens* (Rainey & Rainey, 2003; Spiers, Kahn, Bohannon, Travisano, & Rainey, 2002)), podemos sugerir que este salto evolutivo puede haber tenido lugar por medida por mutaciones relacionadas con procesos que mantienen la unión intercelular.

---

<sup>24</sup> Indudablemente los fenotipos multicelulares actuales son el resultado del proceso evolutivo, y la escasez de formas intermedias en la mayoría de los grupos multicelulares se atribuye a procesos de extinción de los linajes que divergieron temprano que habría retenido los caracteres ancestrales. (Herron 2009; Ratcliff *et al.* 2012; Abedin and King 2010). Siendo la familia Volvovaceae una de las familias que podría presentar formas de transición en la evolución de la multicelularidad (Nozaki *et al.*, 2000).

Pero, el salto hacia la multicelularidad implicada un aspecto clave: la *condicio sine qua non* de la adherencia intercelular. Además, en relación a la cuestión de la estabilidad de las grandes transiciones (Maynard Smith & Szathmary, 1995), en el caso de la multicelularidad el conflicto evolutivo se ha abordado desde el punto de vista que linajes celulares compiten dentro de una entidad multicelular comprometiendo la integridad del grupo. Nuestro fenotipo *snowflake* limita ese conflicto evolutivo al tratarse de un fenotipo que se desarrolla por división incompleta de las células hijas y no por agregación de células que dan lugar a un cluster multicelular. Considerando que se ha identificado la repetitividad en genes subyacentes a la evolución fenotípica (Barrett & Hoekstra, 2011), resulta interesante de cara a futuros estudios, estudiar si la mutación que dio lugar al fenotipo *snowflake* en los diferentes medios estudiados y condiciones estudiadas (entre el Set2, Set3 y Set4) es la misma o puede haber otras mutaciones que resulten en el mismo fenotipo.

Según la bibliografía la multicelularidad puede haber evolucionado más de 20 veces a lo largo de la vida (Bonner, 1998). Esto sugiere que el proceso evolutivo se repite a múltiples niveles y probablemente conserve “soluciones” frente a retos concretos, permitiendo una cierta predecibilidad “esperando” que ciertos fenotipos tengan lugar dentro de un conjunto de condiciones ambientales. Por ejemplo, confiriendo resistencia frente a la expansión de los nuevos fenotipos multicelulares pudo haber facilitado la adaptación a otras condiciones selectivas por medio del incremento de cantidad de variabilidad disponible, por ejemplo confiriendo resistencia frente a la radicación UV. Por lo tanto parece razonable abordar esta transición por medio de evolución experimental para valorar la influencia de factores ambientales. Linajes independientes sujetos a condiciones experimentales similares han evolucionado los mismos rasgos fenotípicos (Rainey & Rainey, 2003; Ratcliff et al., 2013, 2012), como en el caso concreto de nuestro experimento. Podemos sugerir que por medio de seleccionar mutaciones que den lugar a una pérdida de función a nivel de la división, como en el caso del fenotipo *snowflake yeast*, podríamos obtener fenotipos similares en otros microorganismos. En los últimos años se han recopilado un amplio número de ejemplos de evolución convergente (animales que viven en medios líquidos densos evolucionan cuerpos fusiformes o la evolución en diferentes linajes de órganos para la detección de la luz (McGhee, 2011; Powell, 2012)). La problemática surge principalmente, con las recopilaciones de eventos de convergencia evolutiva que tuvo lugar en un pasado lejano de las cuales es difícil identificar las formas ancestrales sujetas a la evolución, o las condiciones ambientales que seleccionan por ese fenotipo concreto.

Por otro lado, llevamos a cabo un segundo experimento para evaluar si la restricción nutricional al eliminar la presión selectiva (selección por sedimentación), si los recientemente seleccionados fenotipos *snowflake yeast* reversionan a su estado ancestral unicelular, es decir si la restricción nutricional actuaba en dirección opuesta al cambio fenotípico de la población inducido por la selección. Además, Ratcliff et al. (2015) han descrito una reducción de fitness por parte de los fenotipos *snowflake yeast* en condiciones no selectivas, relacionándolo con problemas de difusión. Teniendo en cuenta que los fenotipos multicelulares presentan un tamaño mayor, frente a situaciones de escasez de recursos, el tamaño puede no representar una ventaja adaptativa si eliminamos la presión selectiva. La reversibilidad de la evolución ha sido demostrada en diferentes caracteres (Gould, 1990; Whiting, Bradler, & Maxwell, 2003). Como sugirieron Grosberg y Strathmann (Grosberg & Strathmann, 2007), la multicelularidad surgió varias veces en plantas, hongos y bacterias con pérdidas secundarias de esta característica. En poblaciones evolucionadas hacia fenotipos multicelulares, los fenotipos *snowflake* no

## VII.-Discusión

presentaron reversión en ninguna de las condiciones de exposición. Teniendo en cuenta este resultado, sugiere que la reversión hacia la unicelularidad de este fenotipo no tiene lugar bajo condiciones menos favorables. En base a los resultados previos que identifican una mutación a nivel del proceso de separación mitótica durante el proceso de reproducción como causante del fenotipo *snowflake* y a nuestros resultados, aparentemente nuestro fenotipo *snowflake* no es el resultado de genes latentes para la multicelularidad.

Los sistemas vivos y sus ambientes presentan complejas interacciones, y la cuestión de las respuestas idiosincráticas frente a la selección, continúan siendo un tema central dentro de la investigación experimental (Lenski & Travisano, 1994; Travisano, Mongold, Bennett, & Lenski, 1995; Tyerman, Havard, Saxer, Travisano, & Doebeli, 2005). A partir de las intrincadas relaciones entre los organismos y su ambiente surgen múltiples propiedades derivadas de la capacidad de adaptación de los organismos. Resulta difícil identificar que condiciones ambientales han interferido en los procesos que dieron lugar a los primeros organismos pluricelulares, pero como Gould sugirió: “...*in making this second interpretation intelligible by the hypothetical experiment of the tape, promotes a radical view of evolutionary pathways and predictability*” (pp. 50 de su libro “*Wonderful life*” (Gould 1989)).



## ➤ Modelos de comportamientos biológicos a la luz de la evolución.

*Zoocentrism is the primary fallacy of human sociobiology, for this view of human behavior rests on the argument that if the actions of “lower” animals with simple nervous systems arise as genetic products of natural selection, then human behavior should have a similar basis.”*

Stephen Jay Gould

El árbol de la vida está decorado una extraordinaria diversidad de comportamientos animales como la reproducción, la alimentación, el desplazamiento dentro de su ambiente, rehuir predadores, comportamientos sociales, etc., los cuales claramente son grandes determinantes de la supervivencia y del éxito reproductivo, y por ende, se considera que se encuentran bajo acción de la selección natural y sexual (Rhodes & Kawecki, 2009). Mayr lo expresó como “*new behaviors may appear first and genetic changes may follow*” (Mayr, 1958). Desarrollando esta idea, podemos inferir que la primera respuesta de muchos organismos será un ajuste en su comportamiento para tratar de evadir o al menos mejorar frente a los cambios y, que esos cambios, juegan un papel importante dentro de la adaptación. Pese a la infinidad de diversos comportamientos que presenta la vida, dentro de la evolución biológica, la idea de que el comportamiento juega un papel relevante en la evolución ha tenido sus altibajos. Actualmente, gracias la creciente literatura, tenemos evidencias de innovación y comportamiento social desde en la “*smart bacteria*” hasta en los grandes simios, donde no es de extrañar encontrar las mayores capacidades cognitivas. Dentro de la emergente “*multilevel selección theory*” (la teoría de selección multinivel) (Gardner, 2015; Wilson, Van Vugt, & O’Gorman, 2008), que sostiene que la selección puede actuar a diferentes niveles, estudiar los comportamientos sociales o los procesos conductuales resulta de importancia para su contribución al proceso de evolución. Siguiendo esta premisa multinivel, hemos estudiado dos comportamientos en ecosistemas acuáticos desde un abordaje experimental y teórico por medio de la formulación de modelos de competencia.

### *¿Por qué *Microcystis sp.* produce toxinas?*

Dentro de los blooms de cianotoxinas en agua dulce, la mayor parte son producidos por la especie *M. aeruginosa*, principal productora de microcistina. La microcistina es una toxina altamente peligrosa, la cual se ha señalado como motivo de creciente preocupación en términos de seguridad del agua (EPA, 2015). Se estima que un 50% de los blooms de cianobacterias en agua dulce son tóxicos (Bláha, Babica, & Maršálek, 2009), con estimaciones de entorno 59% en algunas encuestas y con mayor incidencia de hepatotoxinas que de otras toxinas (Sivonen & Jones, 1999). Los fenómenos de floraciones masivas de cianobacterias son un fenómeno frecuente a nivel global y que se ha visto incrementado como resultado del cambio global (Huertas, Rouco, López-Rodas, & Costas, 2010; Huertas, Rouco, López-Rodas, & Costas, 2011; Rouco, López-Rodas, Flores-Moya, & Costas, 2011a). Generalmente, la toxicidad no es una característica específica de especie, en el caso de las microcistinas: *Microcystis sp.* presentan genotipos productores y no productores de microcistinas mezclados en las poblaciones naturales (Codd et al., 1999; Kaebernick et al., 2001; Ohtake et al., 1989; Vezie et al., 1998) y su producción está relacionada con el complejo génico de microcistina *myc* (Kurmayer & Christiansen, 2009).

Mientras las condiciones subyacentes a la proliferación de las cianobacterias son bien conocidas, las funciones fisiológicas y bioquímicas de la producción de toxinas continua estando sujeto a numerosas hipótesis (Chorus & Bartram, 1999). El abordaje clásico asume que la producción de toxinas debe conllevar un coste asociado, pero las ventajas correlacionadas con la producción de toxinas compensan ese coste bajo determinadas condiciones. Algunos estudios sugieren que el rol biológico de las microcistinas podría estar relacionado con la prevención del ramoneo por parte del zooplancton, animales filtradores y otros predadores (DeMott, Zhang, & Carmichael, 1991; Haney, 2000; Rohrlack, Henning, & Kohl, 1999; Vanderploeg et al., 2001). Pero estudios previos presentan resultados contradictorios con respecto a la relación entre el componente de fitness y la producción de toxinas, en relación al coste. Por un lado, López-Rodas et al. (2006) evaluaron el componente de heredabilidad de la producción de toxina, resultando en heredabilidades altas. Una heredabilidad alta correlación la varianza fenotípica del carácter producción de toxina, con las diferencias en los genotipos, y normalmente los rasgos con heredabilidades altas están débilmente asociados a la fitness. No obstante, no podemos estimar si la alta heredabilidad se debe a una baja sensibilidad del rasgo a cambios en el ambiente o que la variabilidad encontrada se deba a factores genéticos. Otros estudios, han obtenido una reducción de la fitness en relación a producción de toxina (Briand, Bormans, Quiblier, & Humbert, 2011), lo cual indica un coste en fitness asociado a la producción de toxina. En nuestro estudio, todas las cepas de *Microcystis* sp. productoras de toxinas presentaron una fitness menor que las no-productoras en las mismas condiciones de cultivo no selectivas (medio BG11, 22°C y un flujo de fotones de entre 60-80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), los resultados secundan la relación negativa entre la producción de toxina y el componente de fitness, indicando que existe un coste en fitness asociado a la producción de toxinas con patrón lineal que relaciona la reducción en fitness con la cantidad de toxina producida. Además, en la especie productora de microcistinas *Planktothrix agardhii*, se ha demostrado que bajo competencia entre genotipos productores y no productores, bajo condiciones limitantes para el crecimiento (bajos niveles de nitrógeno, baja intensidad de luz y 10°C), las cepas productoras superan en crecimiento a las no productoras, pero en condiciones no restrictivas el coste de la producción prevalece sobre el beneficio (Briand, Yéprémian, Humbert, & Quiblier, 2008), sugiriendo que la producción de microcistinas representa una ventaja en condiciones selectivas y que su producción conlleva un coste.

Estudios previos bajo diferentes escenarios concluyeron que el la principal fuerza evolutiva que actúa en la producción de toxinas es el azar, tanto en estudios evolutivos sobre la producción de microcistina (Rouco et al., 2011), como en dinoflagelados (Flores-Moya et al., 2012). Teniendo en cuenta estos resultados, estudiamos el efecto de la deriva genética sobre 21 poblaciones de *M. aeruginosa*. Nuestros resultados demostraron que la deriva genética es una fuerza evolutiva actúa modificando las características de la población en relación a la producción de toxinas. Por lo tanto podemos decir que la evolución de un bloom tóxico es impredecible, sugiriendo que la producción de toxinas no parece presentar valor adaptativo (Rouco et al., 2011). Estos resultados concuerdan con la aparente pérdida de los genes productores de microcistina (Rantala et al., 2004), indicando que la presión selectiva sobre este carácter ha decrecido. La deriva genética actúa sobre todas las poblaciones siendo más acusada en poblaciones más reducidas, por lo que su efecto azaroso debería incrementarse por la reducción de la demografía tras un bloom. No obstante, de todas las muestras investigadas de cianobacterias el 60% presentan toxicidad, y dentro de estas poblaciones que presentan toxinas se han descrito ambos genotipos; tanto tóxicos, como no tóxicos, siendo los genotipos productores más numerosos. Se desconoce los factores que interfieren en la dominancia de los genotipos

tóxicos sin embargo, experimento previos con cianobacterias han concluido que la producción de microcistina es una cualidad constante dentro de una cepa o genotipo, pero que pueden modificar su expresión, de alguna manera, en función de las condiciones ambientales (Chorus and Fastner 2001), encontrándose en condiciones de laboratorio variaciones de tres o más órdenes de magnitud (López-Rodas et al., 2006; revisado por Sivonen & Jones, 1999). Los resultados experimentales realizados en esta Tesis respaldan que la producción de toxinas conlleva un coste asociado (en nuestro caso, una reducción en la fitness biológica) y la fuerte influencia del azar sobre este rasgo, empero, no explican la persistencia de los genotipos productores, ni la coexistencia de genotipos tóxicos y no tóxicos dentro de un mismo episodio.

Efectivamente, los microorganismos y las plantas llevan a cabo la toma de “decisiones”. Mitchell et al. (2009) evidenciaron que *E. coli* y *S. cerevisiae* son capaces de anticiparse a cambios en el ambiente mediante adaptación al orden temporal de aparición, y Gilroy y Trewavas (2001) descubrieron que el alga marina *Fucus*, era capaz de identificar más de diez condiciones ambientales diferentes e integrar la información. Por lo tanto, nos planteamos si la producción de toxinas por parte de *Microcystis sp.*, de la cual se desconoce su rol adaptativo, podría explicarse por medio de un modelo de toma de decisión mediante TJE. Dentro de los múltiples enfoques o posibles juegos de TJE, hemos propuesto un juego que plantea un contexto social dentro de las poblaciones que comportan los HABs, a diferencia de los juegos de competencia pura entre individuos. Recientemente, en microorganismos se han identificados diversos comportamientos sociales complejos, incluyendo cooperación a la hora de alimentarse (p. ej. *Myxococcus xanthus* participan en ataques masivos sobre presas microbianas, las cuales se ven superadas en número, descompuestos por las enzimas bacterianas y consumidos (Dworkin, 1996; Shimkets, 1990), o el caso de los dinoflagelados de género *Pfiesteria* que actúan en conjunto, liberando de manera sincronizada toxinas para matar peces a lo largo de kilómetros para después alimentarse de los cadáveres (Burkholder, 1999)), comunicarse (en algunos *Myxococcus* y *Dictyostelium*, se conoce que desarrollan comunicación medida por la secreción de químicos para controlar sus desarrollo multicelular (Dworkin, 1996; Gadagkar & Bonner, 1994; Shimkets, 1990; Shimkets, 1999), o mediante “quorum sensing”, modulando actividades por medio de moléculas de señalización en respuesta a cambios en el ambiente (Miller & Bassler, 2001; Ruby, 1996; Singh et al., 2000)), por mencionar algunos.

Nuestro abordaje de TJE, plantea un juego de dos jugadores (productores y no-productores), compitiendo entre ellos y consigo mismos, y dos estrategias muy influenciadas por factores genéticos (producir o no producir toxinas). En esencia, nuestro modelo plantea una matriz de pagos en relación al éxito reproductivo, en la cual el pago expresado en fitness de un genotipo depende del resultado de su estrategia interaccionando con de forma cooperativa o no cooperativo con las demás estrategias presentes en la población. Cuando por medio del juego se alcanza un punto fijo y estable de la ecuación se considera que se trata de una estrategia evolutivamente estable (EEE), un equilibrio que se mantiene estable frente a la aparición de otras estrategias. Dentro de nuestra matriz de pagos, obtuvimos tres EEE: la prevalencia de productores, la prevalencia de no productores, o actuar a favor de la mayoría en el caso de que se den las dos estrategias en conjunto. Pero ninguno de estos resultados explica la coexistencia de ambos genotipos dentro de un bloom, este equilibrio solo se obtiene si hay una selección dependiente de frecuencia dentro de la población. Se trata de un proceso evolutivo en el cual la aptitud de un genotipo depende de la frecuencia relativa de los demás presentes en la población originando equilibrios polimórficos, habiendo sido relacionado con la



adaptación contra depredadores (Ayala & Campbell, 1974; Clarke, 1979). Gilroy y Trewavas (2001) concluyeron “*is to account for “intelligent” decision-making; computation of the right choice among close alternatives*”, referido a transducción de señales entre células de plantas.

La coexistencia de los genotipos productores y no productores dentro del mismo bloom se explica según nuestro modelo por selección dependiente de frecuencias, pero esto no explica la predominancia de los fenotipos tóxicos dentro de un mismo bloom. En nuestro trabajo, planteamos una explicación mediante selección por parentesco (Hofbauer and Sigmund 2003; Nowak and Sigmund 2005; Nowak 2006), por el cual el coeficiente de parentesco de los cooperadores (genotipo productor), debe ser mayor que el de la población y que de los no-productores. La selección por parentesco se refiere a la estrategia evolutiva que favorece el éxito reproductivo de los parientes del organismo, incluso si supone un coste para reproductivo o de supervivencia para el propio organismo, siendo un comportamiento altruista<sup>25</sup>. Aunque se han llevado a cabo pocas conexiones entre la estructura de las poblaciones genéticas y el comportamiento social en microorganismos, lo poco que se ha descrito sostiene la hipótesis de que el parentesco genético facilita la cooperación (Crespi, 2001). Dentro de las cianobacterias, se ha descrito comportamientos de división de tareas que pueden llegar a considerarse altruistas, como en relación a limitaciones de N, algunas células dentro de las colonias lineales de *Anabaena* sp. desarrollan heterocistes (especializadas morfológicamente y bioquímicamente para fijar N), y como consecuencia pierden irreversiblemente su capacidad de reproducirse (Shapiro 1988; Golden, Robinson, and Haselkorn 1985), permaneciendo unidas a sus parientes clónicas durante el desarrollo. Otros ejemplos en diferentes microorganismos, por mencionar algunos, el reconocimiento entre parientes de formas móviles como *E. coli* o mohos (Mehdiabadi et al., 2006; Mehdiabadi, Kronforst, Queller, & Strassmann, 2009; Nowicki et al., 1985; Senior, 1977).

Gracias a estos estudios, podemos abordar diferentes objetivos encaminados a estudiar comportamientos complejos siguiendo un razonamiento tipo navaja de Ockham<sup>26</sup>. La evolución de la toxicidad de las poblaciones es impredecible debido al elevado componente de azar. Esto dificulta las predicciones sobre el comportamiento tóxico de los blooms, derivando los esfuerzos a controlar los factores que fomentan la aparición de los mismos. Así mismo, la coexistencia de genotipos tóxicos y no tóxicos se explicaría según nuestro modelo, por los beneficios derivados de la producción de cianotoxinas (p. ej. frente a predadores o en condiciones limitantes como descrito por Briand et al. (Briand et al., 2008)) y por selección dependiente de frecuencias.

---

<sup>25</sup> Comportamiento que implica un coste en términos de fitness a un individuo o célula (el altruista), y beneficio para otro individuo o célula (el receptor).

<sup>26</sup> La navaja de Ockham o *lex parsimoniae* se trata de un principio según el cual: en igualdad de condiciones, la teoría o explicación más simple es la más probable. Implicando que la teoría más sencilla, en igualdad de condiciones, es la que tiene más probabilidad de ser correcta. Atribuido a Guillermo de Ockham (1280-1349), fraile franciscano.

### *Una excepción de mercado en peces: los Bienes Giffen.*

Por medio del estudio del mar como mercado, hemos propuesto un modelo en el que las sardinas (*Sardina pilchardus*) como consumidores de subsistencia, con una gran dependencia del bien básico (el fitoplancton) y posibilidades de substitución limitadas (principalmente zooplancton). Por medio de este modelo llevamos a cabo una analogía biológica a la economía. Hemos llevado a cabo un análisis de decisiones individuales, teniendo en cuenta que las sardinas se desagrupan para alimentarse y que presentan alimentación activa y por filtración. Nuestro análisis se ha basado en los requerimientos energéticos, proporcionados en nuestro caso por el plancton. Siguiendo un modelo clásico de forrajeo, asumimos que la evolución ha favorecido estrategias de forraje que maximizan la ingesta de energía como análogo de la fitness. Teniendo en cuenta que un recurso alimentario se agota paulatinamente en relación al tiempo invertido en su captura, la energía marginal obtenida de un recurso depende de tiempo invertido en su adquisición. Nuestro modelo sostiene que en general, las sardinas siguen los principios fundamentales de la ley de la demanda, cuando el precio de un bien incrementa (cuesta más energía capturarlo), se reduce la demanda. Pero, es casos puntuales de reducción del bien básico, los peces como consumidores responden al incremento del precio para obtener el bien básico, mediante una demanda mayor de él, este tipo de bienes se denominan en economía bienes Giffen. Esto se debe a que la energía obtenida de ese bien básico, pero a su incremento en el “precio” energético, sigue siendo mayor en relación a los posibles bienes de substitución. En este segundo caso, el comportamiento encontrado en los peces se asemeja a el comportamiento Giffen (Jensen and Miller 2002), característico de consumidores de subsistencia.

La excepción a esta ley que sigue causando grandes controversias; los bienes Giffen (es la respuesta al incremento de precio de un bien, mediante al aumento de su demanda). Es un tipo de consumo que se ha visto en condiciones de pobreza extrema y bienes de consumo básicos, como el pan o el arroz, en los cuales el consumidor carece de otras opciones. Sin embargo, también se ha identificado un comportamiento Giffen en relación al consumo de otros bienes, por ejemplo el queroseno (Bopp, 1983). Muchos economistas asumen que los bienes Giffen no existen (Stigler, 1947), otros han tratado de probarlos teórica y empíricamente (tanto en humanos (Bopp 1983; Jensen and Miller 2007; Jensen and Miller 2002; Spiegel 1994), como en animales (en ratas (Battalio, Kagel, & Kogut, 1991) y en monos (Silberberg, Warren-Boulton, & Asano, 1987)). Mediante el estudio experimental de los hábitos de alimentación de sardinas y la abundancia de presas disponibles, el plancton, hemos intentado contrastar este modelo. Los resultados del contenido estomacal en sardinas y las abundancias en la columna de agua indican un comportamiento que sigue la ley de la oferta y la demanda con respecto al consumo. Además, en situaciones en las cuales el bien básico se encarece, el fitoplancton, el consumo del mismo se incrementa para alcanzar los requerimientos energéticos, llevando a cabo una conducta que podría ser análoga a la esperada en un bien Giffen. Teniendo en cuenta, que los comportamientos de alimentación van a estar influenciados por la selección natural, podríamos decir que el comportamiento Giffen podría tratarse de una estrategia para incrementar la fitness (Smith 1979; Maynard 1974), por lo tanto es un comportamiento adaptativo en las condiciones ambientales en las que tiene lugar. Por lo tanto, en condiciones de subsistencia, aunque suba el coste energético del bien básico sigue resultando más “rentable” su consumo y su demanda se incrementa. Hay que mencionar que en algunos casos, el consumo no se ajustó a ninguna de los modelos y desconocemos la razón.

Las analogías biológicas a la economía han tenido un gran rechazo (Hodgson, 2002), a diferencia que otras disciplinas como, por ejemplo, los modelos de refuerzo del aprendizaje en psicología. Además, la mayoría de los estudios sobre comportamientos económicos se han hecho en nuestros parientes más cercanos, los primates (Brosnan & de Waal, 2003; Hauser et al., 2003). No obstante, los peces, los cuales pueden considerarse “no-rationales”, ya han demostrado previamente que presentan comportamientos de mercado (Abbott, 2015), por ejemplo el pez limpiador *Labroides dimidiatus* y sus monopolios de limpieza (Bshary & Noë, 2003). En este documento hemos llevado a cabo un estudio de comportamiento económico en peces desde un abordaje evolutivo, sirviéndonos de los paralelismos en teoría económica y los modelos económicos de forrajeo (Kacelnik, 2006; Kalenscher & van Wingerden, 2011; Stephens & Krebs, 1986). En nuestro modelo hicimos una analogía por medio del estudio del mar como mercado de subsistencia y los peces como consumidores básicos. Los animales en la naturaleza presentan un comportamiento económico en tanto que compiten por los mismos recursos escasos presentes en la naturaleza para maximizar su fitness y garantizar su supervivencia y la de su descendencia. El coste-beneficio aplicado en términos de comportamiento animal predice que si un comportamiento es adaptativo, el beneficio de ese comportamiento debe superar el coste. Fundamentalmente, el beneficio y el coste son relativos a la fitness, aunque “divisas” como el tiempo o la energía han sido utilizadas recurrentemente como sustitutos de la fitness. En la mayoría de los casos, los beneficios se han evaluado en términos de incremento de la ingesta de energía, supervivencia o éxito reproductivo. El coste normalmente se relaciona con la reducción de energía o tiempo disponible para comportamientos alternativos (p. ej. reproducirse o la crianza) (Ha, 2010). Si en un caso determinado el coste sobrepasa al beneficio, este comportamiento no será favorecido por la selección natural, y en el caso de que otro comportamiento u otros individuos dentro de la población presenten un desempeño mejor, estos serán mantenidos. Por lo tanto, muchas teorías de ecológicas de toma de decisión presentan muchos puntos en común con los modelos económicos, los cuales se centran en la optimización del comportamiento de toma de decisión (Kalenscher & van Wingerden, 2011). Podríamos decir que ambas escuelas comparten conceptos cruciales como estados de equilibrio en la toma de decisión (Nash, 1950) o en las estrategias evolutivas (Dawkins, 2006), pese a las diferencias fundamentales en términos de unidad de cambio, interés personal o raciocinio. Los comportamientos ecológicos en animales pueden servir de guía para entender comportamientos humanos de mercado, si tenemos en cuenta que esos comportamientos pueden estar determinados evolutivamente (Hammerstein & Hagen, 2005). Estudiar la toma de decisiones económica mediante desde una perspectiva evolutiva en animales mediante comparaciones meticulosas puede ayudar a entender las decisiones microeconómicas (revisado por Kalenscher & van Wingerden 2011).

Actualmente, nuestro respeto por las habilidades “cognitivas” de otros organismos continúa en aumento, parafraseando a Margulis y Sagan; “*At even the most primordial level, living seems to entail sensation, choosing, mind*”<sup>27</sup> (Margulis & Sagan, 1995). Un amplio número de estudios han documentado que varias especies son capaces de llevar cálculos sofisticados sobre el coste-beneficio de un comportamiento condicionado por múltiples variables, incluyendo el coste energético, el riesgo, el tiempo requerido,

---

<sup>27</sup> Licencia poética de Margulis y Sagan, es su libreo “*What is life?*” en el cual argumentan que lo las significativa sobre el comportamiento de los organismos vivos es su habilidad para tomar decisiones (Margulis & Sagan, 1995, pp 180).

cualidad nutricional, abundancias relativas, alternativas de recursos y más (Fernandez-Juricic, Siller, & Kacelnik, 2004; Gillette, Huang, Hatcher, & Moroz, 2000; Ha, 2010; Hobaiter et al., 2014; Hurly & Oseen, 1999; Kie, 1999; Langham, Syme, & Syme, 1975). Muchas de estas “decisiones” son el resultado, al menos en parte, de la experiencia basada en el aprendizaje mediante ensayos de prueba-error que han tenido lugar en el pasado, por observación o incluso aprendizaje “comprensivo”. Se han descrito muchos ejemplos de comportamientos totalmente novedosos por medio del aprendizaje social, imitación o condicionamiento: los herrerillos comunes han aprendido a quitar los tapones de los botes de leche (Cramp, Pettet, & Sharrock, 1960) o la utilización de herramientas en delfines (Krützen et al., 2005). No es de extrañar que en los animales sociales se hayan encontrado las mayores destrezas cognitivas, el aprendizaje social es un medio poderoso de perpetuación y difusión de nuevas adaptaciones sin necesidad de cambios genéticos (Corning, 2014). Otras tantas, se encuentran bajo control genético estricto, con unos criterios de selección “pre-programados”. En biología, se ha estudiado los comportamientos y “decisiones” animales asumiendo que estos optimizan su rendimiento, fitness o eficacia reproductiva bajo presión evolutiva, por lo tanto, han adaptado sus conductas de decisión en consecuencia. Para comprender el origen de los comportamientos de toma de decisión y explicar comportamientos, tenemos que investigar las raíces evolutivas de los procesos de toma de decisión buscando mecanismos de decisión en animales, como complemento a los estudios metodológicos neurológicos y bioquímicos.

Reconocemos la capacidad de aprendizaje e innovación en los organismos vivos destacando el rol del comportamiento en la evolución desde primitivas bacterias, plantas, abejas, palomas, peces, ratones, delfines y chimpancés, entre otras (Corning, 2014). La evolución experimental y los modelos de comportamiento se presentan como herramientas poderosas para identificar el origen y los mecanismos de las variaciones en el comportamiento a diferentes niveles de organización biológica, rutas fisiológicas que determinan el comportamiento o cambios en la expresión de los genes. Sin embargo, hay que tener en cuenta la complejidad a la hora de identificar cual es la esencia de un comportamiento y sus sutiles interacciones dentro del conjunto de factores ambientales.

➤ **“Mejorando” microorganismos para soluciones biotecnológicas**

*In contrast with normal evolution, the “primitive rules” of prokaryotic and protists evolution appear to have been speciation, generalization, and exceptionally long-term survival.*

(Fitch, Ayala, & Schopf, 1994)

La vida microbiana no parece estar limitada a un conjunto de ambientes específicos, las comunidades microbianas se encuentran en las más diversas condiciones, siendo capaces de prosperar en ambientes inhóspitos para cualquier otro tipo de organismo. Un ejemplo claro de éxito adaptativo de los microbios son los organismos extremófilos, capaces de desarrollarse en condiciones nocivas para la mayoría de las formas de vida presentes en la tierra. Los microorganismos son “expertos/maestros” de la adaptación, pueden vivir bajo fuertes presiones selectivas y, en determinados casos, los mecanismos de tolerancia están relacionados con características metabólicas o bioquímicas poco comunes. Los organismos adaptados a ambientes extremos aparte de ser organismos únicos desde el punto de vista evolutivo, presentan generalmente una enzimática particular. Estas particularidades derivadas del proceso adaptivo en muchos casos, resultan de utilidad en el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos y de biorremediación (Margesin & Schinner, 2001; van den Burg, 2003). Siendo el ejemplo canónico las enzimas de la Taq polimerasa aislada por primera vez de la bacteria extremófila *Thermus aquaticus*<sup>28</sup> (Brock & Freeze, 1969; Chien, Edgar, & Trela, 1976). Incluso, la Unión Europea ha financiado durante 4 años investigación en este ámbito con el nombre “*Extremophiles as cells factories*”, que ha generado una amplia bibliografía relacionada con la producción de enzimas y sobre la potencialidad biotecnológica de los microorganismos en ámbitos de biorremediación, biodegradación o procesos redox (Anitori, 2012; Dalmaso, Ferreira, & Vermelho, 2015; Fuciños et al., 2012; Lage et al., 2012; Rampelotto, 2016).

Una de las aplicaciones de los estudios de investigación básica de evolución en microorganismos es la obtención de genotipo o fenotipos seleccionados asociados a un ambiente concreto. Por medio de los estudios experimentales se puede producir tipos de organismos enteramente nuevos para estudios biológicos, literalmente: “*building a better mouse*” (Bennett 2003; Garland 2003). Por su naturaleza, los experimentos de adaptación dan lugar a poblaciones con rasgos que mejoran o empeoran alguna función o a nivel de la fitness global en el nuevo ambiente selectivo, resultando en organismos “mejorados” disponibles para estudios posteriores tanto funcionales o genéticos. Como resultado del proceso de adaptación, en muchos casos, los microorganismos presentan características adaptativas, como crecimiento sobre sustratos restrictivos o un incremento en la generación de moléculas, como ácidos orgánicos como el ácido láctico o málico (Dragosits and Mattanovich 2013; Lee et al. 2011).

---

<sup>28</sup> *Thermus aquaticus* es un organismo extremófilo descrito por primera vez por Thomas D. Brock (Brock & Freeze, 1969), a partir de aguas recogidas en un manantial en el parque *Yellowstone* en Estados Unidos. La Taq polimerasa fue descubierta en 1976 a partir de *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976), se trata de una enzima del tipo ADN-polimerasa termoestable utilizada para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa que permite la ampliación de una secuencia específica de DNA (Saiki et al., 1988).



Actualmente los microorganismos resultan de especial importancia en aplicaciones del tipo biotecnológico o productivo, a la hora de bioremediar (El-Sheekh, Farghl, Galal, & Bayoumi, 2016), biolixiviar (Drogué, Picher, Mercier, & Blais, 2003) o generar biomasa (Sivakumar et al., 2012). En este apartado nos beneficiamos de microorganismos pre-adaptados a condiciones extremas o selectivas naturales y seleccionamos las cepas para una función concreta: la biodegradación de microcistina LR en agua, y la captura de Uranio disuelto en agua. Partiendo de las cepas obtenidas por medio de investigación básica y por medio de selección artificial, hemos realizado una serie de estudios con un enfoque más aplicado para valorar las posibilidades: la eliminación activa de microcistina en agua y la captura y extracción de uranio disuelto en agua.

### *Biodegradación de Microcistina LR por Raoultella planticola*

Las microcistinas son hepatotoxinas actúan bloqueando las proteínas Fosfatasa 1 y 2a de manera irreversible, afectando al hígado y al epitelio intestinal (MacKintosh, Beattie, Klumpp, & Cohen, 1990), siendo una problemática de salud y ambiental. Existen numerosos episodios de intoxicación humana relacionados con ingestión de microcistinas (Azevedo, Carmichael, & Jochimsen, 2002; Jochimsen, Carmichael, & An, 1998; Pouria, Andrade, Barbosa, & Cavalcanti, 1998) y en animales (Handeland & Østensvik, 2010; D. Zhang, Xie, Liu, & Chen, 2007). Además, se ha relacionado la presencia de cianotoxinas en agua con episodios de mortandades masivas en peces y aves (Stewart, Seawright, & Shaw, 2008; Zimba, Khoo, Gaunt, Brittain, & Carmichael, 2001). En definitiva, los HABs suponen una grave amenaza para la salud de seres humanos y animales (Dodds, Bouska, & Eitzmann, 2008), siendo las microcistinas especialmente peligrosas por su toxicidad a dosis bajas y su estabilidad (de Figueiredo et al., 2004). Debido a su importancia, tanto para la salud pública como a nivel del control de la calidad del agua, hemos llevado a cabo un abordaje biotecnológico para eliminar de manera eficiente la toxina del agua.

El resultado fue el desarrollo de un biofiltro (patente española ES2529362 A1), compuesto por un material sorbente inoculado con una bacteria degradadora de microcistina LR. La parte biológica del biofiltro consiste en una bacteria aislada de un bloom tóxico de microcistina, capaz de crecer en presencia de elevadas concentraciones de microcistina de hasta 2 ppb de microcistina LR. La tolerancia a microcistina LR sugiere una capacidad de biodegradación de la misma. La capacidad de biodegradación de microcistina por parte de bacterias está normalmente asociada al hecho de que los microorganismos se encuentran de manera frecuente expuestos a estas toxinas, como demostró Christoffersen et al. (2002) en bacterias heterotróficas. Posteriormente, la bacteria fue seleccionada en el laboratorio por estrés nutricional, seleccionando aquellas cepas capaces de utilizar microcistina LR como fuente única de carbono. La cepa que presentó mejor rendimiento después del proceso de mejora, fue capaz de degradar por encima del 90% concentraciones de 3 ppb de microcistina en 72h. La bacteria fue identificada por secuenciación como *Raoultella planticola* y depositada en el CETC (nº de la cepa: 8390). El potencial de biodegradación de las microcistinas por parte de las bacterias se atribuye a la capacidad natural de las mismas para sintetizar enzimas específicas, como se ha descrito en la especie *Sphingomonas* sp. (Bourne et al., 1996; Bourne, Riddles, Jones, Smith, & Blakeley, 2001; Ho, Gaudieus, Fanok, Newcombe, & Humpage, 2007; Tsuji, Asakawa, Anzai, Sumino, & Harada, 2006), en *Pseudomonas* sp. (Takenaka & Watanabe, 1997) y en *Burkholderia* sp. (Lemes et al., 2008). En el caso de nuestra cepa hemos seleccionado de manera directa la capacidad de degradación por medio de un proceso de mejora genética por selección artificial, mejorando su eficiencia en el consumo de microcistina en comparación con la cepa ancestral aislada (capaz de

biodegradar 0,5 ppb en 72h en medio con nutrientes). *Raoultella planticola* es una bacteria aislada del medio natural, en principio, inocua, aunque se han descrito casos en los que ha actuado como patógeno oportunista (Lam & Salit, 2014; Sia, Wilson, Ananda-Rajah, Mills, & Aung, 2016; Tuğcu, Ruhi, Gokce, Kara, & Aksaray, 2016). Esta bacteria no supone un riesgo para la salud pública, ni para las comunidades biológicas en caso de una filtración. El material sorbente, un filosilicato, se seleccionó por su disponibilidad y su capacidad de adsorción de la microcistina comparativamente con el carbón activo que utilizamos como material de referencia. En conjunto, el material sorbente y la bacteria, alcanzan porcentajes de eliminación de microcistina en agua del 96%. Además, los ensayos de campo, confirmaron su utilidad en condiciones naturales, llegando a eliminar hasta 2,5 ppb de microcistina en agua y fue probado por diferentes empresas de abastecimiento de agua a nivel nacional. Comparativamente con otros abordajes similares, como el biofiltro de carbón activo inoculado con un consorcio bacteriano desarrollado por Minillo *et al.* (2013), la biodegradación de microcistina LR por parte de nuestra cepa fue mucho más rápida. Minillo *et al.* (2013), obtuvieron una degradación por parte del consorcio bacteriano del 70% del valor inicial de microcistina LR ( $20\mu\text{g l}^{-1}$ ) en dos semanas. Tsuji *et al.* (2006) obtuvieron una cepa bacteriana similar a *Sphingomonas* (B-9) capaz de degradar en un día  $2\text{ mg l}^{-1}$  de microcistina LR, tanto inmovilizada como en cultivo líquido, pero el abordaje biotecnológico llevado a cabo fue en biorreactor. Nuestro biofiltro no solo utiliza una bacteria altamente eficiente en la degradación de microcistinas, sino que presenta un material inerte más asequible que el carbón activo capaz de retener la microcistina.

Una de las problemáticas derivadas del cambio global y del calentamiento climático, es el incremento sustancial de la incidencia de blooms, relacionados con la eutrofización de las masas de agua (Davis *et al.*, 2009; Vezie *et al.*, 1997). Debido a la estabilidad de la molécula de microcistina (Tsuji *et al.* 1995; Harada *et al.* 1996), la mayoría de los procesos para evitar su presencia en el agua de abastecimiento se basan en mover la toma de agua a profundidades donde la toxicidad es negativa o la eliminación mediante carbón activo resultando altamente costoso. Los resultados sugieren que el biofiltro para la eliminación de microcistina puede ser una alternativa viable y de bajo coste a los métodos convencionales, presentándose como una posible base para futuras aplicaciones en tecnología de tratamiento de agua. Este proceso ha demostrado su eficacia en ensayos naturales.

#### *Vivir recuperando y enriqueciendo uranio*

El segundo ejemplo de aplicación biotecnológica a partir de resultados de investigación básica que proponemos se trata de utilización de una microalga para la captura y enriquecimiento de uranio disuelto en agua (patente española ES2531010 A1). Los metales pesados como el uranio, dentro de las fuentes de contaminación inorgánica, son los más estudiados debido a su relevancia en la salud pública a corto plazo por la ingestión directa o a medio y largo plazo por la biomagnificación y bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria (Wang & Chen, 2009). La amenaza de los metales pesados ha sido incluso relacionada con la caída del imperio romano (Gilfillan 1965; Smith 1978). Los metales pesados se encuentran de manera natural a pequeñas cantidades en la corteza terrestre y a pesar de que algunos son necesarios para los seres vivos a bajas dosis (p. ej. el hierro o el zinc), su peligrosidad radica en su toxicidad, especialmente aquellos que no presentan funciones biológicas. Tanto la industria como la minería, la fundición de metales, los procesos de producción de energía atómica, etc., producen residuos con

metales pesados que al ser movilizados acaban escapando al medio ambiente y constituyen una seria amenaza. Los microorganismos han demostrado un papel fundamental en la inmovilización de metales, por lo que la biorremediación se considera una técnica con elevado potencial para la eliminación y recuperación de metales del agua (Kuyucak & Volesky, 1988; Vieira & Volesky, 2010; Wilde & Benemann, 1993). Dentro de los tratamientos de biorremediación de metales en el agua, la fitorremediación representa una alternativa eficaz. Las microalgas han sido objeto de numerosos estudios sobre su capacidad para remover de manera eficaz metales (Gekeler, Grill, Winnacker, & Zenk, 1988; Sandau, Sandau, & Pulz, 1996; Suresh Kumar, Dahms, Won, Lee, & Shin, 2015; Wilde & Benemann, 1993).

Las cepas de *Chlamydomonas cf. fonticola*. (cepa *ChIU*), aislada a partir de un ambiente extremo de contaminación por lixiviación de uranio, fueron capaces de captar activamente uranio en la pared celular y bioacumularlo en el interior celular. La bioacumulación intracelular se comprobó mediante difracción de rayos X y se estimó mediante la ruptura de las uniones del uranio a la pared celular por medio de la utilización de EDTA. Existen evidencias que indican que el principal mecanismo para la captación de metales por biomasa es el intercambio iónico, el cual establece fuertes vínculos entre la biomasa y las uniones a diferentes metales (Kalin et al., 2005). La mayoría de las microalgas presentan una pared celular compuesta por polisacáridos y carbohidratos (p. ej. xilano, celulosa...)(Domozych et al., 2012), con cargas negativas en sus superficies que atraen cationes cargados negativamente como cobre, aluminio, zinc y uranio (Marqués, Roca, Simon-Pujol, Fuste, & Congregado, 1991). Por lo tanto consideramos que el proceso de captación que tiene lugar en la pared celular de *ChIU* no se trata de un proceso selectivo. En presencia de varios metales disueltos en el agua, los ligandos de la pared de *ChIU* van a unirse de manera arbitraria a los cationes negativos presentes en el agua independientemente del elemento químico. Así mismo, a mayor número de puntos de unión en la pared celular, mayor es la capacidad de captación pudiendo haber diferencias entre especies de microorganismos (Kalin et al., 2005). La introducción activa de metales a través de la pared celular de microalgas no resulta sorprendente, considerando que muchos metales son nutrientes esenciales. Teniendo en cuenta que se trata de un proceso que requiere energía y que el uranio no presenta actividad biológica alguna, es probable que simule a otro metal que es necesario para la *ChIU*. Una vez en el espacio intracelular, el uranio se acumula en el interior de vacuolas y a veces se precipita (Kalin et al., 2005), lo cual concuerda con los acúmulos evaluados por microanálisis de rayos X en los cortes de ME de nuestra cepa *ChIU*. Pese a que se desconoce la razón por la cual las microalgas introducen uranio en el interior celular, es un proceso descrito en varias especies, por ejemplo en *Scenedesmus* (Pribil & Marvan, 1976) y *Spirogyra* (Mann and Fyfe 1984), pero no en otras especies estudiadas al respecto como en diatomeas o en *Chlorella* (Horikoshi, Nakajima, & Sakaguchi, 1979).

Como resultado de la mejora por selección, obtuvimos una cepa de *ChIU* con mayor tamaño celular y por consiguiente con mayor superficie celular y mayor número de ligandos. La mejora obtenida fue de aproximadamente 2,5 veces más sobre la cepa ancestral, en términos de captura de uranio. Nuestra cepa mejorada, es capaz de bioacumular aproximadamente 10 mg por gramo de biomasa seca de media, siendo 95% del uranio captado mediante adsorción en la pared celular. La bioacumulación de uranio por diferentes tipos de biomasas y microorganismo ha sido ampliamente abordada en la literatura, dando en muchos casos, buenos resultados de captura de uranio por parte de diferentes microorganismos. El Apéndice II recoge la información sobre las distintas biomasas de microorganismos mono-especies, siendo las que más uranio captan por



grupos; la bacteria *Arthobacter nicotianae* (698 mg U/g de biomasa seca), el hongo *Trichoderma harzianu* (612 mg U/g de biomasa seca), el alga *Scendesmus obliquus sp.* (75 mg U/g de biomasa seca), la levadura *Kluyvereomyces marxianus* (115 mg U/g de biomasa seca) y la cianobacteria *Anacystis nidulans* (aprox. 140 mg U/g de biomasa seca). En el caso del uranio, también se han llevado a cabo numerosos estudios de biolixiviación (Abhilash, Pandey, & Ray, 2012; Baranska & Sadowski, 2013; Chen, Sun, & Liu, 2016; Gavrilescu, Pavel, & Cretescu, 2009; Tsezos, McCready, & Bell, 1989). Por lo tanto, la recuperación activa de uranio disuelto en agua por nuestra cepa ChIU presenta una eficiencia más baja con respecto a otros microorganismos estudiados. Sin embargo, las condiciones planteadas en cada situación particular hacen necesario el estudio concreto del ambiente donde se quiere llevar a cabo la captura o el proceso de biolixiviación. La mayoría de los estudios que utilizan microorganismos se llevan a cabo dentro de un rango de pH entre 1,5-5, teniendo en cuenta que la especiación de uranio sufre grandes cambios a pH mayor a 5 dando lugar a complejos con carbonatos e hidróxidos. Previas investigaciones han demostrado que microalgas marinas y cianobacterias tienen mejor eficacia o son incapaces de secuestrar uranio a pH superior a 6 (Nakajima et al., 1979; Sakaguchi et al. 1978).

Nuestra ChIU mejorada resulta una alternativa eficaz para la biorremediación en su charca de origen, la charca minera de Saelices, debido a que esta cepa se encuentra pre-adaptada a las condiciones particulares de este ambiente extremo concreto que hemos estudiado en Saelices. Además, las condiciones de la charca de minería de uranio estudiada (pH en torno a 3), favorecen su biolixiviación medida por microorganismos. El estudio de la bioadsorción activa de uranio en agua por parte de esta cepa resultó en la eliminación de más del 90% del uranio disuelto en 24 días a partir de una solución de 4 ppm de uranio disuelto. La ficorremediación de uranio a partir de aguas de extremas de minería de uranio, presenta una relación coste beneficio muy alta. Las charcas residuales de minería son ambientes altamente contaminados que supone una problemática grave en términos de biorremediación e impacto ambiental. Nuestro lugar de estudio es trata de una serie de charcas de minería de uranio que se encuentra actualmente en restauración (World Nuclear Association, 2016) y se recogen aproximadamente unos 500.00 m<sup>3</sup> al año de los sectores contaminados (grandes vertederos a cielo abierto, antiguas pilas de lixiviación, antiguas minas a cielo abierto, etc.). El agua contaminada (en la superficie, de minería, de filtración y vertido, subterránea...) proviene de la lixiviación ácida de uranio y otros metales del suelo del área minera. El agua necesita ser tratada por su acidez y contenido en metales, incluso después de las tareas de restauración (European Commission, 2012). Las microalgas no requieren un aporte continuo ni grande de nutrientes, este proceso carece de los problemas secundarios derivados de los métodos convencionales (p. ej. la generación de lodos tóxicos) y presenta efectividad en rangos de concentración donde los procesos físico-químicos son técnica y económicamente no viables. La utilización de estas cepas puede reducir significativamente el volumen de un residuo altamente peligroso y con pocas posibilidades de tratamiento como son las charcas de minería de uranio. Asimismo, se puede recuperar el uranio como producto secundario, planteándose como una técnica de biolixiviación y convirtiendo un residuo en un recurso, el uranio capturado por las células puede recuperarse para ser utilizado. Esta técnica presenta como contrapartidas la limitación exclusiva a recursos hídricos y tiempos más dilatados que muchos procedimientos químicos, pero en muchos casos se trata de charcas a cielo abierto cuyo tratamiento se plantea a lo largo de tiempos dilatados.

Durante los procesos de bioacumulación, muchos procesos biológicos llevan a cabo un fraccionamiento isotópico<sup>29</sup>. Por ejemplo, durante el proceso de fotosíntesis, el CO<sub>2</sub> captado se enriquece a <sup>12</sup>C y el O<sub>2</sub> liberado está empobrecido en <sup>18</sup>O; las diferencias isotópicas de azufre, carbono y nitrógeno se utilizan para el trazado de elementos como el carbono en la cadena alimentaria (Hoefs, 2009)... Este proceso suele ser consecuencia de las diferencias de velocidad de difusión o diferencias en las constantes de equilibrio (Bowen, 1960), puesto que químicamente los isótopos son indistinguibles<sup>30</sup>. En general, teniendo en cuenta que las uniones a los isótopos más ligeros resultan más fáciles de romper y reaccionan más rápido, parece evidente que la parte que no ha reaccionado se vea enriquecida en los isótopos más pesados. Pero según lo descrito en la literatura, las células no presentan una preferencia universal, depende del tipo de celular y el metal. Por ejemplo, *A. vinelandii* internaliza el isótopo más pesado del hierro y el más ligero del molibdeno (Wasylenki et al., 2007). Otras especies de bacterias fraccionan a favor de los isótopos más ligeros de hierro y azufre durante la reducción desasimilativa de Fe(III), sulfatos y selenio (Crosby, Roden, Johnson, & Beard, 2007; Johnson, Beard, Klein, & Beukes, 2008). Varios estudios han probado capacidad de fraccionamiento isotópico de uranio con bacterias sulfato reductoras (Stylo et al. 2015; Basu et al. 2014; Czerwinski and Polz 2008; Rademacher et al. 2006), presentando diferencias en relación a las preferencias isotópicas de las bacterias durante los procesos de reducción del uranio (VI) a U (IV). El valor del fraccionamiento se expresa como delta,  $\Delta\delta^{238}\text{U}$  o  $\Delta\delta^{235}\text{U}$ , y se puede calcular tanto sobre la biomasa celular, como en el medio, indicando la preferencia selectiva por un isótopo o por otro. Este proceso de reducción se han estudiado intensamente puesto que el uranio es altamente soluble a pH circumneutral, siendo menos soluble en su forma reducida U (IV), por lo que se plantea como una potencial estrategia de remediación. Rademacher et al., (2006) obtuvieron deltas del  $\Delta\delta^{238}\text{U}$  de entre 0,19-0,26‰ con respecto al estándar de la solución y factores de enriquecimiento ( $\epsilon$ ) entre -0,13 ‰ y -0,34 ‰, indicando que <sup>235</sup>U es preferentemente extraído de la solución. Basu et al. (2014) encontraron preferencias por el isótopo más pesado con  $\Delta\delta^{238}\text{U}$  de hasta -2,18‰, y  $\epsilon$  de entre 0,68‰ y 1,02‰ en las bacterias estudiadas. Stylo et al. (2015) obtuvieron resultados de  $\epsilon$  de 0,86 ± 0,12‰, concordando con Basu et al. (2014) en la preferencia por el isótopo más pesado, y sus resultados indican que la captura de U(VI) al interior celular no es la responsable del fraccionamiento sino que está relacionado con la transferencia enzimática de electrones.

Por lo tanto, la mayoría de los procesos biológicos tienen una preferencia selectiva por un isótopo concreto, pero no parece evidente *a priori* si la preferencia es a favor del isótopo más ligero o el más pesado. Nuestra cepa ChlU presentó un enriquecimiento a favor de <sup>235</sup>U (el isótopo más ligero) con un  $\Delta\delta^{235}\text{U}$  = aproximadamente el 26,54±15,20‰ con respecto al sobrenadante y se mantiene constante a lo largo de 24 días. Las fluctuaciones a lo largo de los 24 días se pueden deber a las diferentes fases del ciclo celular y la densidad celular. Lo cual indica que ChlU enriquece mediante la incorporación activa del isótopo más ligero a partir de un relación isotópica de entorno al 0,72% de <sup>235</sup>U. Hasta nuestro conocimiento, no se han llevado a cabo otros estudios de

<sup>29</sup> Isótopos es la denominación que se aplica a los átomos de un mismo elemento químico, que presentan en su núcleo un número diferente de neutrones, lo cual determina un número másico diferente. Los isótopos de un mismo elemento tienen igual número atómico, puesto que presentan el mismo número de protones en su núcleo, y el mismo número de electrones.

<sup>30</sup> Por norma general, las propiedades químicas de un elemento están determinadas por los protones y electrones de sus átomos, los neutrones en condiciones normales no intervienen en las reacciones químicas. Por lo tanto los isótopos de un mismo elemento presentan un comportamiento químico similar.

la capacidad de fraccionamiento isotópico de uranio mediado por microalgas. Los resultados en bacterias son contradictorios, pero sugieren una preferencia por el isótopo más pesado. Sin embargo, los procesos de fraccionamiento de uranio descritos en bacterias están relacionados con reacciones químicas de reducción, no mediante la asimilación del metal por medio de la actividad celular. Comparativamente con los demás procesos de fraccionamiento biológico descritos en bacterias, nuestra cepa ChIU, presenta un fraccionamiento significativamente más elevado. Los resultados positivos de fraccionamiento darían soporte a algunas teorías que sostienen la contribución biológica en el enriquecimiento del uranio que dio lugar al fenómeno de Oklo, Gabón (Dullies, Lutze, Gong, & Nuttall, 2010; Lovelock, 2000; Nagy, 1993), en el cual las proporciones anómalas de isótopos de uranio sugieren la existencia de seis reactores naturales mantenidos estuvieron activos durante miles de años (Roth, 1977).

Las microalgas han sido ampliamente utilizadas en biotecnología para la generación de biomasas, productos secundarios, bio-energía, depuración de aguas contaminadas, etc. (Anitori, 2012; Borowitzka, 1999; Wilde & Benemann, 1993). Una de las importantes características de las microalgas es su versatilidad. Las microalgas permiten aunar diferentes aplicaciones dentro de un mismo proceso, por ejemplo: tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa para extraer químicos o biodiesel. Complementariamente, los sistemas microalgales, comparativamente con otros microbios, presentan actividad fotosintética, fijando grandes cantidades de CO<sub>2</sub> y liberando O<sub>2</sub>. Uno de los principales usos de las microalgas en biorremediación es la eliminación de metales pesados. Los metales pesados son altamente tóxicos, al tratarse de elementos no son biodegradables y se bioacumulan. Siendo altamente costosa e ineficiente su extracción del agua, especialmente a bajas concentraciones. Los procesos convencionales de extracción de uranio presentan importantes inconvenientes: necesidad de componentes peligrosos que reaccionan con el agua, cantidades importantes de energía, la generación de residuos y los elevados costes, entre otros. Uno de los principales problemas es la restauración de las charcas de minería de uranio. Pese a que se ha estudiado ampliamente la capacidad natural de la biomasa o diferentes microorganismos para recuperar uranio (detalle en Apéndice II), se han llevado a cabo pocos estudios en ambientes concretos. Además, la posibilidad de llevar a cabo un bio-enriquecimiento de uranio apenas ha sido planteada (Czerwinski and Polz 2004). Ciclos sucesivos de enriquecimiento con nuestras algas mejoradas, podría enriquecer uranio hasta niveles por encima de los naturales, presentándose el isotópico biológico de uranio como una alternativa a los procesos actuales. De esta manera, nuestras cepas de ChIU podrían utilizarse para captar uranio del agua, presentándose como una alternativa para reducir el impacto medioambiental. Por medio de la bioacumulación podemos reducir significativamente un residuo altamente peligroso y difícil de eliminar como es el uranio disuelto en el agua. Por otro lado podemos darle utilidad al uranio captado. Este proceso puede actuar como complementario al proceso de extracción minera incrementando las eficiencias de extracción de uranio. Desde el punto de vista del fraccionamiento, podemos incrementar la relación isotópica sobre la relación del mineral natural (aproximadamente 0, 72%) o a partir de un residuo altamente costoso de almacenar como es el uranio empobrecido, incrementar la relación isotópica y dar una segunda vida útil a un residuo. Por último, este proceso presenta la ventaja intrínseca de fijar CO<sub>2</sub> ambiental, reduciendo el impacto ambiental.

En definitiva, los abordajes de biotecnología basados en microorganismos pueden mostrarse efectivos en procesos de biorremediación y gestión de residuos frente a la problemática del cambio global (Mannion, 1993).



## VIII.- CONCLUSIONES

1.- Las diferentes especies dentro del fitoplancton presentan una capacidad de adaptación diferencial frente al incremento de temperatura, sin relación directa con el grupo taxonómico o el nicho ecológico. Como resultado, la diversidad fitoplanctónica puede verse reducida, alterando la biogeografía futura de las poblaciones y favoreciendo a las especies con mayor plasticidad.

2.- La adaptación rápida del fitoplancton a presiones selectivas letales tiene lugar gracias a mutaciones espontáneas, al azar, presentes en la población antes de la exposición al agente selectivo. La variabilidad generada por recombinación genética durante la reproducción sexual puede acelerar la adaptación ambientes extremos.

3.- La restricción nutricional no resulta limitante a la hora de obtener por selección fenotipo multicelular *Snowflake yeast* a partir de su ancestro unicelular. Tampoco implica una reversión hacia la unicelularidad a partir de un fenotipo *snowflake*. Sin embargo, las diferencias ecológicas pueden dar lugar a diferentes resultados en la evolución hacia la pluricelularidad. Las complejas, y siempre fluctuantes, interacciones de los fenotipos y su ambiente pueden ayudar a la persistencia de subpoblaciones (en nuestro caso el fenotipo unicelular), así como la expansión de metapoblaciones (persistencia de la población mixta, unicelular y *snowflake yeast*).

4.- La teoría de juegos evolutiva sirve de herramienta para abordar algunas dinámicas evolutivas que no se corresponden con la supervivencia del más apto. Por medio de teoría de juegos evolutiva, la co-existencia de los genotipos tóxicos y no tóxicos dentro de un HABs de *Microcystis sp.* podría ser explicada como el resultado de una selección dependiente de frecuencias y la predominancia del genotipo tóxico dentro de lo HABs, se puede explicar por selección por parentesco.

5.- Por medio de nuestro modelo de mercado en peces como consumidores de subsistencia y en términos económicos de optimización de energía, al incrementarse el precio del bien básico la demanda del mismo se ve incrementada para cubrir los requerimientos energéticos como se describe en los bienes Giffen. Nuestros estudios experimentales se han identificado conductas análogas al comportamiento Giffen en las condiciones que impone el modelo. Por lo tanto, este tipo de comportamiento podría suponer una ventaja adaptativa, y encontrarse bajo presión evolutiva.

6.- A partir de una bacteria aislada de un HABs de *microcystis sp.*, por medio selección artificial, hemos obtenido una cepa de *R. planticola* capaz de degradar hasta 2,5 ppb de microcistina del agua en 72 horas. Partiendo de esta cepa, llevamos a cabo el desarrollo de un biofiltro compuesto de un material inerte y la cepa degradadora para eliminar activamente microcistina en agua, el cual ha sido probado con éxito por diferentes empresas de agua.

7.- Mediante mejora genética por selección artificial hemos obtenido una cepa de *Chlamydomonas cf. fonticola* capaz de captar hasta 10 mg de uranio por g de biomasa seca, un 60% más de uranio que la obtenida de la naturaleza. Así mismo es capaz de producir fraccionamiento isotópico en el proceso de bioacumulación.



## VIII.- CONCLUSIONS

1.- Species within the phytoplankton present a differential adaptive capacity against the increase of temperature, without direct relation with the taxonomic group or the ecological niche. As a result, phytoplankton diversity may be reduced altering the future biogeography of populations and favoring the species with greater plasticity.

2.- Rapid adaptation of phytoplankton to lethal selective pressures occurs though spontaneous, random mutations prior to the exposure to the selective agent. The variability generated by genetic recombination during sexual reproduction can accelerate adaptation under extreme environments.

3.- Nutritional restriction is not limiting when selecting the multicellular Snowflake yeast phenotype from its unicellular ancestor, *S. cerevisiae*. Nor does it imply a reversion towards the unicellular from a snowflake phenotype. However, ecological complexity may lead to different outcomes in the evolution towards multicellularity. The complex, and always fluctuating, interactions between phenotypes and their environment can help the persistence of subpopulations (in our case the unicellular phenotype), as well as the expansion of metapopulations (persistence of mixed population, both unicellular and snowflake yeast).

4.- Evolutionary game theory serves as a tool to address some evolutionary dynamics that do not meet the “survival of the fittest”. By means of evolutionary game theory, the co-existence of toxic and non-toxic genotypes within a HABs of *Microcystis* sp. could be explained as the result of frequency-dependent selection and the predominance of the toxic genotype within the HABs, by kin selection.

5.- Through our market model in sardines, behaving as subsistence consumers and in terms of energy optimization, as the price of the basic good increases, the demand grow. This happen to achieve the energy requirements of the consumers, as described in the Giffen goods. Our experimental studies have identified behaviors analogous to Giffen behavior under the conditions imposed by the model. Therefore, this type of behavior could be adaptive, and be under evolutionary pressure.

6.- Through artificial selection, a *R. planticola* bacterium strain, isolated from a HABs of *microcystis* sp., was capable of degrading up to 2.5 ppb of microcystin in 72 hours. On this basins, we carried out the development of a biofilter composed of an inert material and the degrading strain to actively remove microcystin in water, which has been successfully tested by different water companies.

7.- Through genetic enhancement by artificial selection we obtained a strain of *Chlamydomonas cf. fonticola* able to capture up to 10 mg of uranium per gram of dry biomass, 60% more uranium than the strain isolated from the sampling site. It is also capable of isotope fractionation in the process of bioaccumulation.





## XIX.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, A. (2015). Animal behaviour: Inside the cunning, caring and greedy minds of fish. *Nature*, 521(7553), 412–414. <http://doi.org/10.1038/521412a>
- Abedin, M., & King, N. (2010). Diverse evolutionary paths to cell adhesion. *Trends in Cell Biology*, 20(12), 734–42. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.002>
- Abhilash, B. D. P., & Ray, L. (2012). Bioleaching of apatite rich low grade Indian uranium ore. *Canadian Metallurgical Quarterly*, 51(4), 390–402. <http://doi.org/10.1179/1879139512Y.00000000024>
- Acharya, C., Joseph, D., & Apte, S. K. (2009). Uranium sequestration by a marine cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* strain BDU/75042. *Bioresource Technology*, 100(7), 2176–2181. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.047>
- Ahlers, J., Stock, F., & Werschkun, B. (2008). Integrated testing and intelligent assessment-new challenges under REACH. *Environmental Science and Pollution Research International*, 15(7), 565–72. <http://doi.org/10.1007/s11356-008-0043-y>
- Akhtar, K., Khalid, A. M., Akhtar, M. W., & Ghauri, M. A. (2009). Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by Ca-alginate immobilized *Trichoderma harzianum*. *Bioresource Technology*, 100(20), 4551–4558. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.073>
- Akhtar, K., Waheed Akhtar, M., & Khalid, A. M. (2007). Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by *Trichoderma harzianum*. *Water Research*, 41(6), 1366–1378. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.009>
- Alexander, D., & Fairbridge, R. W. (1999). *Encyclopedia of environmental science*. Kluwer Academic Publishers.
- Allègre, C. J., Manhès, G., & Göpel, C. (1995). The age of the Earth. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(8), 1445–1456. [http://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00054-4](http://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00054-4)
- Allen, J., Weinrich, M., Hoppitt, W., & Rendell, L. (2013). Network-Based Diffusion Analysis Reveals Cultural Transmission of Lobtail Feeding in Humpback Whales. *Science*, 340(6131), 485–488. <http://doi.org/10.1126/science.1231976>
- Allwood, A. C., Walter, M. R., Kamber, B. S., Marshall, C. P., & Burch, I. W. (2006). Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature*, 441(7094), 714–718. <http://doi.org/10.1038/nature04764>
- Anderson, D. M. (1989). Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*, 11–16.
- Anderson, D. M., & Keafer, B. A. (1987). An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Nature*, 325(6105), 616–617. <http://doi.org/10.1038/325616a0>
- Anitori, R. P. (2012). *Extremophiles: Microbiology and Biotechnology*. Norfolk, UK: Casiter Academic Press.

- Arahal, D. R., Sanchez, E., & Rovira, M. M. (2008). Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "Leuconostocaceae. *Int Microbiology*, 11(1), 33–9.
- Arfsten, D. P., Still, K. R., & Ritchie, G. D. (2001). A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development. *Toxicology and Industrial Health*, 17(5–10), 180–91.  
<http://doi.org/10.1191/0748233701TH111OA>
- Armiento, G., Bellatreccia, F., Cremisini, C., Della Ventura, G., Nardi, E., & Pacifico, R. (2013). Beryllium natural background concentration and mobility: a reappraisal examining the case of high Be-bearing pyroclastic rocks. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(1), 559–572. <http://doi.org/10.1007/s10661-012-2575-3>
- Ayala, F. J., & Campbell, C. A. (1974). Frequency-Dependent Selection. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5(1), 115–138.  
<http://doi.org/10.1146/annurev.es.05.110174.000555>
- Azevedo, S., Carmichael, W., & Jochimsen, E. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 181–182, 441–6. [http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2)
- Báez, J. C., Real, R., López-rodas, V., Costas, E., & Enrique, A. (2014). The North Atlantic Oscillation and the Arctic Oscillation are drivers of HABs in SW Europe. *Harmful Algae*, 39, 121–126. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2014.07.008>
- Baos, R., García-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Hiraldo, F., & Costas, E. (2002). Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcóllar mine spill. *European Journal of Phycology*, 37(4), 593–600.  
<http://doi.org/10.1017/S096702620200392X>
- Barange, M., Field, J. G., Harris, R. P., Hofmann, E. E., Perry, R. I., & Werner, F. (Eds.). (2010). *Marine Ecosystems and Global Change*. Oxford University Press.  
<http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199558025.001.0001>
- Baranska, J., & Sadowski, Z. (2013). Bioleaching of uranium minerals and biosynthesis of UO<sub>2</sub> nanoparticles. *Physicochemical Problems of Mineral*, 49(1), 71–79.
- Barbante, C., Veyseyre, A., & Ferrari, C. (2001). Greenland snow evidence of large scale atmospheric contamination for platinum, palladium, and rhodium. *Environmental Science & Technology*, 35(5), 835–839.  
<http://doi.org/10.1021/es000146y>
- Barrett, R. D. H., & Hoekstra, H. E. (2011). Molecular spandrels: tests of adaptation at the genetic level. *Nature Reviews Genetics*, 12(11), 767–780.  
<http://doi.org/10.1038/nrg3015>
- Basu, A., Sanford, R. A., Johnson, T. M., Lundstrom, C. C., & Löffler, F. E. (2014). Uranium isotopic fractionation factors during U(VI) reduction by bacterial isolates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 136, 100–113.  
<http://doi.org/10.1016/j.gca.2014.02.041>

- Batayneh, A. T. (2012). Toxic (aluminum, beryllium, boron, chromium and zinc) in groundwater: health risk assessment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 9(1), 153–162. <http://doi.org/10.1007/s13762-011-0009-3>
- Battalio, R. C., Kagel, J. H., & Kogut, C. A. (1991). Experimental Confirmation of the Existence of a Giffen Good. *The American Economic Review*, 81(4), 961–970.
- Bednarska, A. J., Jevtić, D. M., & Laskowski, R. (2013). More ecological ERA: incorporating natural environmental factors and animal behavior. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 9(3), e39-46. <http://doi.org/10.1002/ieam.1444>
- Behrenfeld, M. J., O'Malley, R. T., Siegel, D. A., McClain, C. R., Sarmiento, J. L., Feldman, G. C., ... Boss, E. S. (2006). Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature*, 444(7120), 752–5. <http://doi.org/10.1038/nature05317>
- Belkin, I. (2009). Rapid warming of large marine ecosystems. *Progress in Oceanography*, 81(1–4), 207–213. <http://doi.org/10.1016/j.pocean.2009.04.011>
- Bell, G. (1982). *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. London: Croom Helm.
- Bell, G., & Collins, S. (2008). Adaptation, extinction and global change. *Evolutionary Applications*, 1(1), 3–16. <http://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00011.x>
- Bell, G., & Gonzalez, A. (2009). Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters*, 12(9), 942–8. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01350.x>
- Bengtsson, L., Johansson, B., Hackett, T. J., McHale, L., & McHale, A. P. (1995). Studies on the biosorption of uranium by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(5), 807–11.
- Bennett, A. F. (2003). Experimental Evolution and the Krogh Principle: Generating Biological Novelty for Functional and Genetic Analyses. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(1), 1–11. <http://doi.org/10.1086/374275>
- Bennett, A. F., & Lenski, R. E. (1999). Experimental Evolution and Its Role in Evolutionary Physiology. *American Zoologist*, 39(2), 346–362. <http://doi.org/10.1093/icb/39.2.346>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Cells Can Respond to Changes in Their Environments*. W H Freeman.
- Bhainsa, K. C., & D'Souza, S. F. (1999). Biosorption of uranium(VI) by *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology Techniques*, 13(10), 695–699. <http://doi.org/10.1023/A:1008915814139>
- Bickham, J. W. (2011). The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. *Ecotoxicology (London, England)*, 20(3), 497–502. <http://doi.org/10.1007/s10646-011-0636-y>
- Biermann, F., Betsill, M. M., Vieira, S. C., Gupta, J., Kanie, N., Lebel, L., ... Zondervan, R. (2010). Navigating the anthropocene: the Earth System Governance Project strategy paper. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2(3), 202–208. <http://doi.org/10.1016/j.cosust.2010.04.005>

- Björkman, J., Nagaev, I., Berg, O., & Hughes, D. (2000). Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science*, 287(5457), 1479–82. <http://doi.org/10.1126/science.287.5457.1479>
- Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(2), 36–41. <http://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2>
- Bonner, J. T. (1998). The origins of multicellularity. *Integrative Biology: Issues, News, and Reviews*, 1(1), 27–36. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6602\(1998\)1:1](http://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6602(1998)1:1)
- Bopp, A. E. (1983). The demand for kerosene: A modern giffen good. *Applied Economics*, 15(4), 459–468. <http://doi.org/10.1080/000368483000000017>
- Boraas, M. E., Seale, D. B., & Boxhorn, J. E. (1998). Phagotrophy by a flagellate selects for colonial prey: A possible origin of multicellularity. *Evolutionary Ecology*, 12(2), 153–164. <http://doi.org/10.1023/A:1006527528063>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1), 313–321. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3–4), 591–604. [http://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00036-3](http://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00036-3)
- Botstein, D., & Fink, G. R. (2011). Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics*, 189(3), 695–704. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>
- Bourne, D. G., Jones, G. J., Blakeley, R. L., Jones, A., Negri, A. P., & Riddles, P. (1996). Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4086–94.
- Bourne, D. G., Riddles, P., Jones, G. J., Smith, W., & Blakeley, R. L. (2001). Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environmental Toxicology*, 16(6), 523–534. <http://doi.org/10.1002/tox.10013>
- Bowen, H. J. M. (1960). Biological Fractionation of Isotopes. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 7(4), 261–272. [http://doi.org/10.1016/0020-708X\(60\)90115-0](http://doi.org/10.1016/0020-708X(60)90115-0)
- Bower, F. O. (1908). *The origin of a land flora, a theory based upon the facts of alternation, by F.O. Bower ... With numerous illustrations*. London,: Macmillan and co., limited,. <http://doi.org/10.5962/bhl.title.1698>
- Boyce, D. G., Lewis, M. R., & Worm, B. (2010a). Global phytoplankton decline over the past century. *Nature*, 466(7306), 591–596. <http://doi.org/10.1038/nature09268>
- Boyce, D. G., Lewis, M. R., & Worm, B. (2010b). Global phytoplankton decline over the past century. *Nature*, 466(7306), 591–6. <http://doi.org/10.1038/nature09268>
- Boyd, P. W., Ryneerson, T. A., Armstrong, E. A., Fu, F., Hayashi, K., Hu, Z., ... Thomas, M. K. (2013). Marine Phytoplankton Temperature versus Growth Responses from Polar to Tropical Waters – Outcome of a Scientific Community-

- Wide Study. *PLoS ONE*, 8(5), e63091.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063091>
- Bradbury, S. P., Feijtel, T. C. J., & Leeuwen, C. J. Van. (2004). Peer Reviewed: Meeting the Scientific Needs of Ecological Risk Assessment in a Regulatory Context. *Environmental Science & Technology*, 38(23), 463A–470A.  
<http://doi.org/10.1021/es040675s>
- Briand, E., Bormans, M., Quiblier, C., & Humbert, J.-F. (2011). Différence de fitness entre la souche *Microcystis aeruginosa* PCC7806 et son mutant non toxique en condition optimale de croissance: coût de production de la microcystine?
- Briand, E., Yéprémian, C., Humbert, J.-F., & Quiblier, C. (2008). Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environmental Microbiology*, 10(12), 3337–3348. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01730.x>
- Brito, E. M. S., Piñón-Castillo, H. A., Guyoneaud, R., Caretta, C. A., Gutiérrez-Corona, J. F., Duran, R., ... Goñi-Urriza, M. (2013). Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 369–378. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-3923-5>
- Brock, T. D., & Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98(1), 289–97.
- Brosnan, S. F., & de Waal, F. B. M. (2003). Monkeys reject unequal pay. *Nature*, 425(6955), 297–299. <http://doi.org/10.1038/nature01963>
- Bshary, R., & Noë, R. (2003). Biological Markets : The Ubiquitous Influence of Partner Choice on the Dynamics of Cleaner Fish - Client Reef Fish Interactions. *Genetic and Cultural Evolution of Cooperation*, 9, 167–184.
- Büchel, C., & Wilhelm, C. (1993). In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives. *Photochemistry and Photobiology*, 58(1), 137–148. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb04915.x>
- Buckling, A., Craig Maclean, R., Brockhurst, M. A., & Colegrave, N. (2009). The Beagle in a bottle. *Nature*, 457(7231), 824–9. <http://doi.org/10.1038/nature07892>
- Burke, M. K., Liti, G., & Long, A. D. (2014). Standing genetic variation drives repeatable experimental evolution in outcrossing populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology and Evolution*, 31(12), 3228–39. <http://doi.org/10.1093/molbev/msu256>
- Burkholder, J. M. (1999). The lurking perils of *Pfiesteria*. *Scientific American*, 281(2), 42–9.
- Buss, L. (2014). *The evolution of individuality*. Princeton University Press.
- Bustard, M., Donnellan, N., Rollan, A., McHale, L., & McHale, A. P. (1996). The effect of pulse field strength on electric field stimulated biosorption of uranium by *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnology Letters*, 18(4), 479–482. <http://doi.org/10.1007/BF00143474>



- Bustard, M., & McHale, A. P. (1997). Biosorption of uranium by cross-linked and alginate immobilized residual biomass from distillery spent wash. *Bioprocess Engineering*, 17(3), 127–130. <http://doi.org/10.1007/s004490050365>
- Butterfield, N. J. (2000). Bangiomorpha pubescens n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology*, 26(3). [http://doi.org/10.1666/0094-8373\(2000\)026<0386:BPNGNS>2.0.CO;2](http://doi.org/10.1666/0094-8373(2000)026<0386:BPNGNS>2.0.CO;2)
- Butterwick, C., Heaney, S. I., & Talling, J. F. (2004). Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biology*, 50(2), 291–300. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01317.x>
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8(3), 559–568. [http://doi.org/10.1890/1051-0761\(1998\)008\[0559:NPOSWW\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008[0559:NPOSWW]2.0.CO;2)
- Carroll, S. (2001). Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature*, 409, 1102–1109. <http://doi.org/10.1038/35059227>
- Catalogue of Life. (2017). Retrieved February 1, 2017, from <http://www.catalogueoflife.org/>
- Cavalier-Smith, T., Brasier, M., & Embley, T. M. (2006). Introduction: How and when did microbes change the world? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1470), 845–50. <http://doi.org/10.1098/rstb.2006.1847>
- Cavalli-Sforza, L., & Feldman, M. (1981). *Cultural transmission and evolution: a quantitative approach*. Princeton University Press.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1(5), e1400253. <http://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>
- Cermeño, P., Dutkiewicz, S., Harris, R. P., Follows, M., Schofield, O., & Falkowski, P. G. (2008). The role of nutricline depth in regulating the ocean carbon cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20344–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0811302106>
- Chapin, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., ... Díaz, S. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405(6783), 234–242.
- Chassot, E., Bonhommeau, S., Dulvy, N., & Mélin, F. (2010). Global marine primary production constrains fisheries catches. *Ecology Letters*, 13, 495–505. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01443.x>
- Chen, C., Sedwick, P. N., & Sharma, M. (2009). Anthropogenic osmium in rain and snow reveals global-scale atmospheric contamination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 7724–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0811803106>

- Chen, G., Sun, Z., & Liu, Y. (2016). Continued Multicolumns Bioleaching for Low Grade Uranium Ore at a Certain Uranium Deposit. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1–7. <http://doi.org/10.1155/2016/1683416>
- Chen, H., Lin, F., Xing, K., He, X., Michod, R. E., Roze, D., ... Kuiper, M. (2015). The reverse evolution from multicellularity to unicellularity during carcinogenesis. *Nature Communications*, 6, 6367. <http://doi.org/10.1038/ncomms7367>
- Chen, L., Xiao, S., Pang, K., Zhou, C., & Yuan, X. (2014). Cell differentiation and germ-soma separation in Ediacaran animal embryo-like fossils. *Nature*, 516(7530), 238–41. <http://doi.org/10.1038/nature13766>
- Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–7.
- Chorus, I., & Bartram, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. E & FN Spon.
- Chorus, I., & Fastner, J. (2001). Recreational exposure to cyanotoxins. In *Cyanotoxins-occurrence, causes, consequences* (pp. 190–199). Springer.
- Christoffersen, K., Lyck, S., & Winding, A. (2002). Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquatic Microbial Ecology*, 27(2), 125–136. <http://doi.org/10.3354/ame027125>
- Clarke, B. (1979). The evolution of genetic diversity. *Proceedings of the Royal Society of*. <http://doi.org/10.1098/rspb.1979.0079>
- Cloern, J., & Dufford, R. (2005). Phytoplankton community ecology: principles applied in San Francisco Bay. *Marine Ecology Progress Series*, 285, 11–28. <http://doi.org/10.3354/meps285011>
- Cockell, C. S., Catling, D. C., Davis, W. L., Snook, K., Kepner, R. L., Lee, P., & McKay, C. P. (2000). The ultraviolet environment of Mars: biological implications past, present, and future. *Icarus*, 146(2), 343–59.
- Codd, G., Bell, S., Kaya, K., Ward, C., Beattie, K., & Metcalf, J. (1999). Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, 34(4), 405–415. <http://doi.org/10.1080/09670269910001736462>
- Colegrave, N. (2002). Sex releases the speed limit on evolution. *Nature*, 420(6916), 664–6. <http://doi.org/10.1038/nature01191>
- Collins, J., Baer, B., & Weber, E. J. (2016). Evolutionary Biology in Economics: A Review. *Economic Record*, 92(297), 291–312. <http://doi.org/10.1111/1475-4932.12260>
- Connon, R. E., Geist, J., & Werner, I. (2012). Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(9), 12741–71. <http://doi.org/10.3390/s120912741>
- Corning, P. A. (2014). Evolution “on purpose”: how behaviour has shaped the evolutionary process. *Biological Journal of the Linnean Society*, 112(2), 242–260. <http://doi.org/10.1111/bij.12061>
- Costanza, R. (1999). The ecological, economic, and social importance of the oceans.

*Ecological Economics*, 31(2), 199–213. [http://doi.org/10.1016/S0921-8009\(99\)00079-8](http://doi.org/10.1016/S0921-8009(99)00079-8)

- Costas, E., Fernandez, J. L., Piqueras, P., & Varela, M. (1988). A precise ultrastructural quantification in *Prorocentrum micans* Ehrenberg (Dinophyceae) by stereology. *Investigacion Pesquera (Spain)*.
- Costas, E., Flores-Moya, A., & López-Rodas, V. (2008). Rapid adaptation of phytoplankters to geothermal waters is achieved by single mutations: were extreme environments “Noah”s Arks’ for photosynthesizers during the Neoproterozoic “snowball Earth”? *The New Phytologist*, 180(4), 922–32. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02620.x>
- Costas, E., Flores-Moya, A., Perdigones, N., Maneiro, E., Blanco, J. L., García, M. E., & López-Rodas, V. (2007a). How eukaryotic algae can adapt to the Spain’s Rio Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *The New Phytologist*, 175(2), 334–9. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02095.x>
- Costas, E., González-Gil, S., Aguilera, A., & López-Rodas, V. (1992). A Morphometrical Analysis of Ultrastructural Changes during the Cell Cycle of *Prorocentrum triestinum* Using Stereology. *Botanica Marina*, 35(5). <http://doi.org/10.1515/botm.1992.35.5.429>
- Costas, E., & Varela, M. (1988). A circannual rhythm in cysts formation and growth rates in the dinoflagellate *Scripsiella trochoidea* Stein. *Chronobiologia*, 16(3), 235–270.
- Craft, E. S., Abu-Qare, A. W., Flaherty, M. M., Garofolo, M. C., Rincavage, H. L., & Abou-Donia, M. B. (2004). Depleted and natural uranium; chemistry and toxicological effect. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 7(4), 297–317. <http://doi.org/10.1080/10937400490452714>
- Cramp, S., Pettet, A., & Sharrock, J. (1960). The irruption of tits in autumn 1957. *Brit. Birds*, 53(4977), 99–117.
- Crespi, B. J. (2001). The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(4), 178–183. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02115-2](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02115-2)
- Crosby, H., Roden, E., Johnson, C., & Beard, B. (2007). The mechanisms of iron isotope fractionation produced during dissimilatory Fe (III) reduction by *Shewanella putrefaciens* and *Geobacter sulfurreducens*. *Geobiology*, 5(2), 169–189. <http://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00103.x>
- Crow, J. F., & Kimura, M. (1970). *An introduction to population genetics theory*. Universidad de California.
- Crutzen, P. (2006). *The anthropocene. Earth system science in the anthropocene*. [http://doi.org/10.1007/3-540-26590-2\\_3](http://doi.org/10.1007/3-540-26590-2_3)
- Crutzen, P. J., & Stoermer, E. F. (2000). The Anthropocene. *Global Change Newsletter*, 41, 17–18.
- Czerwinski, K., & Polz, M. (2008). Uranium enrichment using microorganisms. *US Patent 7,452,703*.



- Czerwinski, K. R., & Polz, M. F. (2004). Uranium enrichment using microorganisms.
- D'Souza, S. F., Sar, P., Kazy, S. K., & Kubal, B. S. (2006). Uranium Sorption by Pseudomonas Biomass Immobilized in Radiation Polymerized Polyacrylamide Bio-Beads. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41(3), 487–500. <http://doi.org/10.1080/10934520500428377>
- Dajoz, R. (1974). *Tratado de ecología*. (second, Ed.) (Mundi-Pren). Madrid.
- Dallinger, W. H. (1878). “On the Life-History of a Minute Septic Organism: With an Account of Experiments Made to Determine Its Thermal Death Point.” *Proceedings of the Royal Society of London*, 27, 332–350. <http://doi.org/10.1098/rspl.1878.0055>
- Dallinger, W. H. (1887). The President's Address. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 7(2), 185–199. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1887.tb01566.x>
- Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1925–65. <http://doi.org/10.3390/md13041925>
- Dalrymple, G. B. (2001). The age of the Earth in the twentieth century: a problem (mostly) solved. *Geological Society, London, Special Publications*, 190(1), 205–221. <http://doi.org/10.1144/GSL.SP.2001.190.01.14>
- Darimont, C. T., Fox, C. H., Bryan, H. M., & Reimchen, T. E. (2015). The unique ecology of human predators. *Science*, 349(6250), 858–860. <http://doi.org/10.1126/science.aac4249>
- Darwin, C. (1859a). Conclusions. In *Origin of Species by means of natural selection, or Preservation of favoured races in the Struggle for life*. (1st ed., p. 490). London: John Murray, Albemarle street.
- Darwin, C. (1859b). *On the Origin of Species by means of Natural Selection*. London: John Murray, Albemarle street.
- Daufresne, M., Lengfellner, K., & Sommer, U. (2009). Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12788–93. <http://doi.org/10.1073/pnas.0902080106>
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 8(5), 715–725. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004>
- Dawkins, R. (2006). *The selfish gene*. Oxford University Press.
- de Figueiredo, D. R., Azeiteiro, U. M., Esteves, S. M., Gonçalves, F. J. M., & Pereira, M. J. (2004). Microcystin-producing blooms--a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 151–63. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.04.006>
- Deblonde, T., & Cossu-Leguille, C. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 442–448. <http://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>

- del Mar Fernández-Arjona, M., Bañares-España, E., García-Sánchez, M. J., Hernández-López, M., López-Rodas, V., Costas, E., & Flores-Moya, A. (2013). Disentangling mechanisms involved in the adaptation of photosynthetic microorganisms to the extreme sulphureous water from Los Baños de Vilo (S Spain). *Microbial Ecology*, 66(4), 742–51. <http://doi.org/10.1007/s00248-013-0268-2>
- Delwiche. (1999). Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. *The American Naturalist*, 154(S4), S164–S177. <http://doi.org/10.1086/303291>
- DeMott, W. R., Zhang, Q.-X., & Carmichael, W. W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 36(7), 1346–1357. <http://doi.org/10.4319/lo.1991.36.7.1346>
- Dettman, J. R., Sirjusingh, C., Kohn, L. M., & Anderson, J. B. (2007). Incipient speciation by divergent adaptation and antagonistic epistasis in yeast. *Nature*, 447(7144), 585–588. <http://doi.org/10.1038/nature05856>
- Dixon, W. J., & Mood, A. M. (1946). The statistical sign test. *Journal of the American Statistical Association*, 41(236), 557–66.
- Dobzhansky, T. G. (1937). *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press. New York.
- Dodds, W., Bouska, W., & Eitzmann, J. (2008). Eutrophication of US freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environmental Science & Technology*, 43(1), 12–19. <http://doi.org/10.1021/es801217q>
- Domozych, D. S., Ciancia, M., Fangel, J. U., Mikkelsen, M. D., Ulvskov, P., & Willats, W. G. T. (2012). The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3, 82. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>
- Doughty, C. E., Wolf, A., & Field, C. B. (2010). Biophysical feedbacks between the Pleistocene megafauna extinction and climate: The first human-induced global warming? *Geophysical Research Letters*, 37(15), n/a-n/a. <http://doi.org/10.1029/2010GL043985>
- Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution -- principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 12, 64. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*, 148(4), 1667–1686.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 925–932. <http://doi.org/10.1099/00207713-51-3-925>
- Drogué, P., Picher, S., Mercier, G., & Blais, J. (2003). Cinétique de biolixiviation d'un résidu minier de pyrite en présence d'effluents organiques utilisés comme milieu de culture pour *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Environmental Technology*, 24(11), 1413–1423. <http://doi.org/10.1080/09593330309385685>

- Dullies, F., Lutze, W., Gong, W., & Nuttall, H. E. (2010). Biological reduction of uranium—From the laboratory to the field. *Science of The Total Environment*, 408(24), 6260–6271. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.018>
- Dworkin, M. (1996). Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews*, 60(1), 70–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8852896>
- Edmunds, W. M., & Trafford, J. M. (1993). Beryllium in river baseflows, shallow groundwaters and major aquifers of the UK. *App Geochem*, (Suppl. Issue 2), 223–33.
- El-Sheekh, M. M., Farghl, A. A., Galal, H. R., & Bayoumi, H. S. (2016). Bioremediation of different types of polluted water using microalgae. *Rendiconti Lincei*, 27(2), 401–410. <http://doi.org/10.1007/s12210-015-0495-1>
- El Albani, A., Bengtson, S., Canfield, D. E., Bekker, A., Macchiarelli, R., Mazurier, A., ... Meunier, A. (2010). Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature*, 466(7302), 100–4. <http://doi.org/10.1038/nature09166>
- Elena, S. F., & Lenski, R. E. (2003). Microbial genetics: Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 4(6), 457–469. <http://doi.org/10.1038/nrg1088>
- EPA. (2015). *Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins*. EPA- 820R15100.
- Erwin, D. H. (2008). Macroevolution of ecosystem engineering, niche construction and diversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(6), 304–10. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2008.01.013>
- Escobar-Páramo, P., Ghosh, S., & DiRuggiero, J. (2005). Evidence for genetic drift in the diversification of a geographically isolated population of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus*. *Molecular Biology and Evolution*, 22(11), 2297–303. <http://doi.org/10.1093/molbev/msi227>
- Etterson, J. R., Shaw, R. G., Davis, M. B., Shaw, R. G., Antonovics, J., Lande, R., ... Kelly, C. A. (2001). Constraint to adaptive evolution in response to global warming. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5540), 151–4. <http://doi.org/10.1126/science.1063656>
- European Commission. (2012). *Southern and western Spain – former uranium installations and national monitoring*. ES-12/06.
- EUROSTAT. (2014). Chemicals production statistics. Retrieved from [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Chemicals\\_production\\_statistics](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Chemicals_production_statistics)
- Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics* (4th ed.). Edinburgh: Longman Group Ltd.
- Falkowski, P., Barber, R., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5374), 200–7. <http://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>

- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5682), 354–60. <http://doi.org/10.1126/science.1095964>
- Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2013). *Aquatic Photosynthesis: (Second Edition)*.
- Farré, M. la, Pérez, S., & Kantiani, L. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991–1007. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies and Quantitative Characters. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1), 445–471. <http://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.002305>
- Fernandez-Juricic, E., Siller, S., & Kacelnik, A. (2004). Flock density, social foraging, and scanning: an experiment with starlings. *Behavioral Ecology*, 15(3), 371–379. <http://doi.org/10.1093/beheco/arh017>
- Field, Behrenfeld, Randerson, & Falkowski. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5374), 237–40. <http://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V., & Raven, J. A. (2010). Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*, 32(1), 119–137. <http://doi.org/10.1093/plankt/fbp098>
- Fitch, W. M., Ayala, F. J., & Schopf, J. W. (1994). Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic (cyanobacteria/hypobryozoa/living fossils), 91, 6735–6742.
- Fleming, L. E., Rivero, C., Burns, J., Williams, C., Bean, J. A., Shea, K. A., & Stinn, J. (2002). Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae*, 1(2), 157–168. [http://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00026-4](http://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00026-4)
- Fletcher, J. A., & Zwick, M. (2007). The evolution of altruism: Game theory in multilevel selection and inclusive fitness. *Journal of Theoretical Biology*, 245(1), 26–36. <http://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.09.030>
- Fletcher, L. (2001). New Zealand GMO debacle undermines green lobby. *Nature Biotechnology*, 19(4), 292–292. <http://doi.org/10.1038/86618>
- Flores-Moya, A., Costas, E., Bañares-España, E., García-Villada, L., Altamirano, M., & López-Rodas, V. (2005). Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through preselective mutations. *The New Phytologist*, 166(2), 655–61. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01325.x>
- Flores-Moya, A., Costas, E., & López-Rodas, V. (2008). Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*. *Die Naturwissenschaften*, 95(8), 697–703. <http://doi.org/10.1007/s00114-008-0372-1>
- Flores-Moya, A., Rouco, M., García-Sánchez, M. J., García-Balboa, C., González, R.,

- Costas, E., & López-Rodas, V. (2012). Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification. *Ecology and Evolution*, 2(6), 1251–9. <http://doi.org/10.1002/ece3.198>
- Fogg, G. E. (2001). Algal adaptation to stress, some general remarks. In L. C. Rai & J. P. Gaur (Eds.), *Algas adaptation to Environmental stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. (pp. 1–20). Springer Berlin Heidelberg.
- Forbes, V., Calow, P., Grimm, V., Hayashi, T., Jager, T., Katholm, A., ... Stillman, R. (2011). Adding Value to Ecological Risk Assessment with Population Modeling. *Valery Forbes Publications*. Retrieved from <http://digitalcommons.unl.edu/biosciforbes/4>
- Forest, A., Tremblay, J., Gratton, Y., & Martin, J. (2011). Biogenic carbon flows through the planktonic food web of the Amundsen Gulf (Arctic Ocean): A synthesis of field measurements and inverse modeling analyses. *Progress in*, 91(4), 410–436. <http://doi.org/10.1016/j.pocean.2011.05.002>
- Fortin, C., Dutel, L., & Garnier-Laplace, J. (2004). Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 23(4), 974–81. <http://doi.org/10.1897/03-90>
- Foster, P. L. (2006). Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods in Enzymology*, 409, 195–213. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)09012-9](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)09012-9)
- Foster, S. A. (2013). Evolution of behavioural phenotypes: influences of ancestry and expression. *Animal Behaviour*, 85(5), 1061–1075. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.02.008>
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195(1), 1–10.
- Fox, J. W., Nelson, W. a., & Mccauley, E. (2010). Coexistence mechanisms and the paradox of the plankton: Quantifying selection from noisy data. *Ecology*, 91(6), 1774–1786. <http://doi.org/10.1890/09-0951.1>
- Fragata, I., Simões, P., Lopes-Cunha, M., Lima, M., Kellen, B., Bárbaro, M., ... Suess, J. (2014). Laboratory Selection Quickly Erases Historical Differentiation. *PLoS ONE*, 9(5), e96227. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0096227>
- Freeman, S., Freeman, & Stephen. (2015). Occurrence and Production of Beryllium. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (pp. 1–11). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <http://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc2284>
- Friis, N., & Myers-Keith, P. (1986). Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(1), 21–28. <http://doi.org/10.1002/bit.260280105>
- Fuciños, P., González, R., Atanes, E., Sestelo, A. B. F., Pérez-Guerra, N., Pastrana, L., & Rúa, M. L. (2012). Lipases and esterases from extremophiles: overview and case example of the production and purification of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 861, 239–66. [http://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_15](http://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_15)



- Gadagkar, R., & Bonner, J. (1994). Social insects and social amoebae. *Journal of Biosciences*, 19(2), 219–245. <http://doi.org/10.1007/BF02703057>
- Gagnon, Z. E., Newkirk, C., & Hicks, S. (2006). Impact of Platinum Group Metals on the Environment: A Toxicological, Genotoxic and Analytical Chemistry Study. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41(3), 397–414. <http://doi.org/10.1080/10934520500423592>
- Galloway, J. N., & Cowling, E. B. (2002). Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio*, 31(2), 64–71. <http://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.64>
- Gan, J. O., Walton, M. E., & Phillips, P. E. M. (2010). Dissociable cost and benefit encoding of future rewards by mesolimbic dopamine. *Nature Neuroscience*, 13(1), 25–27. <http://doi.org/10.1038/nn.2460>
- García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., García-Sánchez, A., Igual, J. M., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2013). Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 116–123. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.003>
- Gardner, A. (2015). The genetical theory of multilevel selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(2), 305–319. <http://doi.org/10.1111/jeb.12566>
- Garland, J. T. (2003). Selection experiments: an under-utilized tool in biomechanics and organismal biology. *Vertebrate Biomechanics and Evolution*, 23–56.
- Garland, T., Bennett, A. F., & Rezende, E. L. (2005). Phylogenetic approaches in comparative physiology. *Journal of Experimental Biology*, 208(16), 3015–3035. <http://doi.org/10.1242/jeb.01745>
- Garland, T., & Kelly, S. (2006). Phenotypic plasticity and experimental evolution. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2344–2361.
- Garland, T., & Rose, M. R. (2009). *Experimental evolution : concepts, methods, and applications of selection experiments*. University of California Press.
- Gaston, K. (2003). *The structure and dynamics of geographic ranges*. Oxford University Press.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32(1), 147–156. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>
- Gavrilescu, M., Pavel, L. V., & Cretescu, I. (2009). Characterization and remediation of soils contaminated with uranium. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2), 475–510. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.103>
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E., & Zenk, M. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology*, 150(2), 197–202. <http://doi.org/10.1007/BF00425162>
- Genç, Ö., Yalçinkaya, Y., Büyüktuncel, E., Denizli, A., Arica, M. ., & Bektaş, S. (2003). Uranium recovery by immobilized and dried powdered biomass: characterization and comparison. *International Journal of Mineral Processing*,

- 68(1), 93–107. [http://doi.org/10.1016/S0301-7516\(02\)00062-5](http://doi.org/10.1016/S0301-7516(02)00062-5)
- Genty, B., Briantais, J.-M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1), 87–92. [http://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](http://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J. S., Mills, J. A., & Merilä, J. (2008). Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, 17(1), 167–78. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03413.x>
- Gilbert, J. A., Neufeld, J. D., Pasteur, L., Nuttal, G., Thierfelder, H., Reyniers, J., ... Smith, A. (2014). Life in a World without Microbes. *PLoS Biology*, 12(12), e1002020. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002020>
- Gilfillan, S. (1965). Lead poisoning and the fall of Rome. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 7(2), 53–60.
- Gillespie, R. (2008). Updating Martin's global extinction model. *Quaternary Science Reviews*, 27(27), 2522–2529. <http://doi.org/10.1016/j.quascirev.2008.09.007>
- Gillette, R., Huang, R. C., Hatcher, N., & Moroz, L. L. (2000). Cost-benefit analysis potential in feeding behavior of a predatory snail by integration of hunger, taste, and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3585–90. <http://doi.org/10.1073/PNAS.97.7.3585>
- Gilroy, S., & Trewavas, A. (2001). Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(4), 307–314. <http://doi.org/10.1038/35067109>
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 251–60. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005>
- Goddard, M. R., Godfray, H. C. J., & Burt, A. (2005). Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature*, 434(7033), 636–40. <http://doi.org/10.1038/nature03405>
- Goff, L., & Moon, D. (1993). PCR Amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *Journal of Phycology*, 29(3), 381–384. <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00381.x>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567. <http://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Golab, Z., Orlowska, B., & Smith, R. W. (1991). Biosorption of lead and uranium by *Streptomyces* sp. *Water, Air, and Soil Pollution*, 60(1–2), 99–106. <http://doi.org/10.1007/BF00293968>
- Golden, J. W., Robinson, S. J., & Haselkorn, R. (1985). Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature*, 314(6010), 419–423. <http://doi.org/10.1038/314419a0>
- González-Muñoz, M. T., Merroun, M. L., Ben Omar, N., & Arias, J. M. (1997). Biosorption of uranium by *Myxococcus xanthus*. *International Biodeterioration &*

- Biodegradation*, 40(2), 107–114. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00041-3](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00041-3)
- Gonzalez, A., & Bell, G. (2012). Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1610), 20120079–20120079. <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0079>
- Gonzalez, A., Ronce, O., Ferriere, R., & Hochberg, M. E. (2013). Evolutionary rescue: an emerging focus at the intersection between ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1610), 20120404. <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0404>
- Gorokhova, E., Hajdu, S., Larsson, U., Edvardsen, B., Eikrem, W., Throndsen, J., ... Paasche, E. (2014). Responses of Phyto- and Zooplankton Communities to *Prymnesium polylepis* (Prymnesiales) Bloom in the Baltic Sea. *PLoS ONE*, 9(11), e112985. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0112985>
- Gould. (1990). Wonderful life: The Burgess shale and the nature of history. *Trends in Ecology & Evolution*, 5(11), 375–376. [http://doi.org/10.1016/0169-5347\(90\)90105-M](http://doi.org/10.1016/0169-5347(90)90105-M)
- Gould, S. J. (1989). *Wonderful Life: The Burges Shale and the Nature of History*. New York, Norton.
- Gould, S. J. (1996). *The mismeasure of man*. Norton.
- Gould, S. J., & Eldredge, N. (1972). Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. In T. J. M. Schopf (Ed.), *Models in paleobiology* (pp. 82–115). Freeman Cooper and Co.
- Grayson, D. K. (1984). Explaining Pleistocene extinctions: Thoughts on the structure of a debate. In P. S. Martin & R. G. Klein (Eds.), *Quaternary extinctions: a prehistoric revolution* (pp. 807–823). University of Arizona Press.
- Gregg, M. C., Sanford, T. B., & Winkel, D. P. (2003). Reduced mixing from the breaking of internal waves in equatorial waters. *Nature*, 422(6931), 513–5. <http://doi.org/10.1038/nature01507>
- Gresham, D., Desai, M. M., Tucker, C. M., Jenq, H. T., Pai, D. A., Ward, A., ... Dunham, M. J. (2008). The Repertoire and Dynamics of Evolutionary Adaptations to Controlled Nutrient-Limited Environments in Yeast. *PLoS Genetics*, 4(12), e1000303. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000303>
- Grosberg, R. K., & Strathmann, R. R. (2007). The Evolution of Multicellularity: A Minor Major Transition? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 621–654. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.114735>
- Ha, R. R. (2010). Cost-benefit Analysis. In M. D. Breed & J. Moore (Eds.), *Encyclopedia of Animal Behavior* (pp. 402–405). Seattle: Elsevier.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Deluchat, V., & Lenain, J. (2009). Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquatic Toxicology*, 94(4), 225–264. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.007>
- Hafez, N., Abdel-Razek, A. S., & Hafez, M. B. (1997). Accumulation of Some Heavy Metals on *Aspergillus flavus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*,



- 68(1), 19–22. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199701\)68:1<19::AID-JCTB508>3.0.CO;2-K](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199701)68:1<19::AID-JCTB508>3.0.CO;2-K)
- Halim, Y. (1960). *Alexandrium minutum*, n. gen. n. sp. dinoflagellate provocant des eaux rouges. *Vie Milieu*, 11, 102–105.
- Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. I. *Journal of Theoretical Biology*, 7(1), 1–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5875341>
- Hammerstein, P., & Hagen, E. H. (2005). The second wave of evolutionary economics in biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(11), 604–9. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.012>
- Handeland, K., & Østensvik, Ø. (2010). Microcystin poisoning in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Toxicon*, 56(6), 1076–1078. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.023>
- Haney, J. (2000). The impact of the toxic strain of *Microcystis aemginosa* on *Daphnia magna*. In *Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress* (p. 457).
- Hans Wedepohl, K. (1995). The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(7), 1217–1232. [http://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00038-2](http://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00038-2)
- Hansen, J., Ruedy, R., Sato, M., & Lo, K. (2010). Global surface temperature change. *Reviews of Geophysics*, 48(4), RG4004. <http://doi.org/10.1029/2010RG000345>
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., & Lo, K. (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14288–14293. <http://doi.org/10.1073/pnas.0606291103>
- Harada, K., Tsuji, K., Watanabe, M. F., & Kondo, F. (1996). Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature. *Phycologia*, 35(6S), 83–88. <http://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-83.1>
- Hauser, M. D., Chen, M. K., Chen, F., & Chuang, E. (2003). Give unto others: genetically unrelated cotton-top tamarin monkeys preferentially give food to those who altruistically give food back. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1531), 2363–70. <http://doi.org/10.1098/rspb.2003.2509>
- Henshilwood, C. S., & Marean, C. W. (2003). The Origin of Modern Human Behavior. *Current Anthropology*, 44(5), 627–651. <http://doi.org/10.1086/377665>
- Henzi, S., & Barrett, L. (2002). Infants as a commodity in a baboon market. *Animal Behaviour*, 63(5), 915–921. <http://doi.org/10.1006/anbe.2001.1986>
- Hernández-Becerril, D. U., Cortés Altamirano, R., & Alonso R., R. (2000). The dinoflagellate genus *Prorocentrum* along the coasts of the Mexican Pacific. *Hydrobiologia*, 418(1), 111–121. <http://doi.org/10.1023/A:1003806719515>
- Herron, M. D. (2009). Many from one: Lessons from the volvocine algae on the evolution of multicellularity. *Communicative & Integrative Biology*, 2(4), 368–70.
- Herron, M. D., Hackett, J. D., Aylward, F. O., & Michod, R. E. (2009). Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3254–3258. <http://doi.org/10.1073/pnas.0811205106>

- Hindin, R., Brugge, D., & Panikkar, B. (2005). Teratogenicity of depleted uranium aerosols: a review from an epidemiological perspective. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, 4, 17. <http://doi.org/10.1186/1476-069X-4-17>
- Ho, L., Gaudieux, A.-L., Fanok, S., Newcombe, G., & Humpage, A. R. (2007). *Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity*. *Toxicon* (Vol. 50). <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.021>
- Hobaiter, C., Poisot, T., Zuberbühler, K., Hoppitt, W., Gruber, T., Franz, M., ... Laland, K. (2014). Social Network Analysis Shows Direct Evidence for Social Transmission of Tool Use in Wild Chimpanzees. *PLoS Biology*, 12(9), e1001960. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001960>
- Hodgson, G. M. (2002). Darwinism in economics: from analogy to ontology. *Journal of Evolutionary Economics*, 12(3), 259–281. <http://doi.org/10.1007/s00191-002-0118-8>
- Hoefs, J. (2009). *Stable Isotope Geochemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-70708-0>
- Hoegh-Guldberg, O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research*, 50(8), 839. <http://doi.org/10.1071/MF99078>
- Hofbauer, J., & Sigmund, K. (2003). Evolutionary game dynamics. *Bulletin of the American Mathematical Society*. Retrieved from <http://www.ams.org/bull/2003-40-04/S0273-0979-03-00988-1/>
- Holland, A., & Kinnear, S. (2013). Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide? *Marine Drugs*, 11(7), 2239–58. <http://doi.org/10.3390/md11072239>
- Holland, H. D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1470), 903–915. <http://doi.org/10.1098/rstb.2006.1838>
- Holmes, M. T. (1995). *Ecological assessment after the addition of genetically engineered Klebsiella planticola SDF20 into soil*. Oregon State University.
- Hooke, R. L., & Martín-Duque, J. F. (2012). Land transformation by humans: A review. *GSA Today*, 12(12), 4–10. <http://doi.org/10.1130/GSAT151A.1>
- Horikoshi, T., Nakajima, A., & Sakaguchi, T. (1979). Uptake of Uranium by *Chlorella regularis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(3), 617–623. <http://doi.org/10.1080/00021369.1979.10863502>
- Houghton, J., Ding, Y., Griggs, D., & Noguer, M. (2001). *Climate change 2001: the scientific basis*. Cambridge University Press.
- Hu, M. Z.-C., Norman, J. M., Faison, B. D., & Reeves, M. E. (1996). Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU: Characterization and comparison studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(2), 237–247. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960720\)51:2<237::AID-BIT14>3.0.CO;2-J](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960720)51:2<237::AID-BIT14>3.0.CO;2-J)
- Hu, M. Z. C., & Reeves, M. (1997). Biosorption of Uranium by *Pseudomonas*

- aeruginosa Strain CSU Immobilized in a Novel Matrix. *Biotechnology Progress*, 13(1), 60–70. <http://doi.org/10.1021/bp9600849>
- Huang, J. J., Kolodny, N. H., Redfearn, J. T., & Allen, M. M. (2002). Rapid transient growth at low pH in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Archives of Microbiology*, 177(6), 486–493. <http://doi.org/10.1007/s00203-002-0419-1>
- Hudnell, H. K., Dortch, Q., & Zenick, H. (2008). An Overview of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB): Advancing the Scientific Understanding of Freshwater Harmful Algal Blooms. In *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs* (pp. 1–16). New York, NY: Springer New York. [http://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7\\_1](http://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_1)
- Huertas, I. E., Rouco, M., López-Rodas, V., & Costas, E. (2010). Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *The New Phytologist*, 188(2), 478–87. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03370.x>
- Huertas, I. E., Rouco, M., López-Rodas, V., & Costas, E. (2011). Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278(1724), 3534–3543. <http://doi.org/10.1098/rspb.2011.0160>
- Huey, R. B., Hertz, P. E., & Sinervo, B. (2003). Behavioral Drive versus Behavioral Inertia in Evolution: A Null Model Approach. *The American Naturalist*, 161(3), 357–366. <http://doi.org/10.1086/346135>
- Huey, R., Gilchrist, G., & Hendry, A. (2005). Using invasive species to study evolution. In *Species invasions: Insights to ecology, evolution and biogeography* (pp. 139–164).
- Hughes, L. (2000). Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution*, 15(2), 56–61. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01764-4](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01764-4)
- Hurly, T. A., & Oseen, M. D. (1999). Context-dependent, risk-sensitive foraging preferences in wild rufous hummingbirds. *Animal Behaviour*, 58(1), 59–66. <http://doi.org/10.1006/anbe.1999.1130>
- Hutchinson, G. E. (1961). The Paradox of the Plankton. *The American Naturalist*, 95(882), 137–145.
- Huxley, J. (1942). *Evolution: the Modern Synthesis* (Allen and). London: Allen & Unwin.
- Imam, S. H., Buchanan, M. J., Shin, H. C., & Snell, W. J. (1985). The Chlamydomonas cell wall: characterization of the wall framework. *The Journal of Cell Biology*, 101(4), 1599–607. <http://doi.org/0021-9525/85/10/1599/09>
- IOC-UNESCO. (2002). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae (HABs). Retrieved from <http://www.marinespecies.org/hab/>
- IPCC. (2007). *Intergovernmental Panel on Climate Change. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK.

- IPCC. (2013). *Detection and Attribution of Climate Change, en: Summary for Policymakers*.
- Jasser, I., Karnkowska-Ishikawa, A., & Chróst, R. J. (2013). Do acid-tolerant picocyanobacteria exist? A study of two strains isolated from humic lakes in Poland. *Hydrobiologia*, 707(1), 209–218. <http://doi.org/10.1007/s10750-012-1428-y>
- Jenkins, G. S., & Smith, S. R. (1999). GCM simulations of snowball earth conditions during the Late Proterozoic. *Geophysical Research Letters*, 26(15), 2263–2266. <http://doi.org/10.1029/1999GL900538>
- Jensen, R., & Miller, N. (2007). *Giffen Behavior: Theory and Evidence*. Cambridge, MA. <http://doi.org/10.3386/w13243>
- Jensen, R. T., & Miller, N. (2002). Giffen Behavior in China: Evidence from the China Health and Nutrition Survey. *Harvard University, RWP-02-014*.
- Jensen, R. T., & Miller, N. H. (2008). Giffen Behavior and Subsistence Consumption. *The American Economic Review*, 98(4), 1553–1577. <http://doi.org/10.1257/aer.98.4.1553>
- Jochimsen, E., Carmichael, W., & An, J. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338, 873–878. <http://doi.org/10.1056/NEJM199803263381304>
- Joehnk, K., Huisman, J., & Sharples, J. (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change*, 14(3), 495–512. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01510.x>
- John, D. M., & Tsarenko, P. M. (2002). Order Chlorococcales. In A. J. John, D.M., Whitton, B.A., Brook (Ed.), *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae* (pp. 327–409). Cambridge: Cambridge University Press.
- Jöhnk, K. D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P. M., & Stroom, J. M. (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology*, 14(3), 495–512. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01510.x>
- Johnson, C., Beard, B., Klein, C., & Beukes, N. (2008). Iron isotopes constrain biologic and abiologic processes in banded iron formation genesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(1), 151–169. <http://doi.org/10.1016/j.gca.2007.10.013>
- Jones, B. M., Iglesias-Rodriguez, M. D., Skipp, P. J., Edwards, R. J., Greaves, M. J., Young, J. R., ... Rost, B. (2013). Responses of the *Emiliana huxleyi* Proteome to Ocean Acidification. *PLoS ONE*, 8(4), e61868. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061868>
- Jordan, R. W., Green, J. C., Billard, C., Billard, C., Gayral, P., Bourrelly, P., ... Wallich, G. C. (1994). A check-list of the extant Haptophyta of the world. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 74(1), 149. <http://doi.org/10.1017/S0025315400035736>
- Kacelnik, A. (2006). Meanings of rationality. *Rational Animals*, 887–106.
- Kaebernick, M., Rohrlack, T., Christoffersen, K., & Neilan, B. A. (2001). A

- spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environmental Microbiology*, 3(11), 669–679.  
<http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00241.x>
- Kagel, J. H., Battalio, R. C., & Green, L. (1995). *Economic choice theory : an experimental analysis of animal behavior*. Cambridge University Press.
- Kaiser, D. (2001). Building a Multicellular Organism. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 103–123. <http://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090145>
- Kalenscher, T., & Pennartz, C. M. A. (2008). Is a bird in the hand worth two in the future? The neuroeconomics of intertemporal decision-making. *Progress in Neurobiology*, 84(3), 284–315. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.11.004>
- Kalenscher, T., & van Wingerden, M. (2011). Why We Should Use Animals to Study Economic Decision Making – A Perspective. *Frontiers in Neuroscience*, 5, 82. <http://doi.org/10.3389/fnins.2011.00082>
- Kalenscher, T., Windmann, S., Diekamp, B., Rose, J., Güntürkün, O., & Colombo, M. (2005). Single Units in the Pigeon Brain Integrate Reward Amount and Time-to-Reward in an Impulsive Choice Task. *Current Biology*, 15(7), 594–602. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.052>
- Kalin, M., Wheeler, W. N., & Meinrath, G. (2005). The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *Journal of Environmental Radioactivity*, 7878(2), 151–177. <http://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.05.002>
- Kallas, T., & Castenholz, R. W. (1982). Rapid transient growth at low pH in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 237–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6798020>
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS One*, 6(2), e16015. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>
- Kasai, F., & Hanazato, T. (1995). Effects of the triazine herbicide, simetryn, on freshwater plankton communities in experimental ponds. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 89(2), 197–202.
- Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., & Whitlock, M. C. (2012). Experimental evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(10), 547–560. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.001>
- Keightley, P. D., & Otto, S. P. (2006). Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations. *Nature*, 443(7107), 89–92. <http://doi.org/10.1038/nature05049>
- Kettlewell, H. B. D. (1958). A survey of the frequencies of *Biston betularia* (L.) (Lep.) and its melanic forms in Great Britain. *Heredity*, 12, 51–72. <http://doi.org/10.1038/hdy.1958.4>
- Kie, J. G. (1999). Optimal Foraging and Risk of Predation: Effects on Behavior and Social Structure in Ungulates. *Journal of Mammalogy*, 80(4), 1114–1129. <http://doi.org/10.2307/1383163>
- Kim, S., Hwang, J., & Lee, D. (2008). Prefrontal Coding of Temporally Discounted



Values during Intertemporal Choice. *Neuron*, 59(1), 161–172.  
<http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.010>

- Kimura, M., & Maruyama, T. (1966). The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics*, 54(6), 213–220.
- Kinnison, M. T., & Haist, N. G. (2007). Eco-evolutionary conservation biology: contemporary evolution and the dynamics of persistence. *Functional Ecology*, 21(3), 444–454. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01278.x>
- Kirk, D. L. (2005). A twelve-step program for evolving multicellularity and a division of labor. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 27(3), 299–310. <http://doi.org/10.1002/bies.20197>
- Klug, W. S., & Cummings, M. R. (1999). *Genética de Poblaciones*. In *Conceptos de Genética* (5th ed., p. 709). Madrid: Prentice Hall Iberica.
- Kluyver, A. J., & van Niel, C. B. (1956). *The Microbe's Contribution to Biology*. Harvard University Press. Cambridge.
- Knoll, A. (1992). The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science*, 256(5057), 622–627. <http://doi.org/10.1126/science.1585174>
- Knoll, A. H. (2011). The Multiple Origins of Complex Multicellularity. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39(1), 217–239.  
<http://doi.org/10.1146/annurev.earth.031208.100209>
- Knoll, A. H., Javaux, E. J., Hewitt, D., & Cohen, P. (2006). Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1470), 1023–38.  
<http://doi.org/10.1098/rstb.2006.1843>
- Koch, P. L., & Barnosky, A. D. (2006). Late Quaternary Extinctions: State of the Debate. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37(1), 215–250.  
<http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132415>
- Kolbert, E. (2014). *The Sixth Extinction: An Unnatural History*. Henry Holt & Company.
- Kondrashov, A. S. (1988). Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336(6198), 435–440. <http://doi.org/10.1038/336435a0>
- Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2012). Evolution of microbes and viruses: a paradigm shift in evolutionary biology? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 119.  
<http://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00119>
- Koschwanetz, J. H., Foster, K. R., & Murray, A. W. (2011). Sucrose utilization in budding yeast as a model for the origin of undifferentiated multicellularity. *PLoS Biology*, 9(8), e1001122. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001122>
- Koskela, M., & Annala, A. (2012). Looking for the Last Universal Common Ancestor (LUCA). *Genes*, 3(1), 81–7. <http://doi.org/10.3390/genes3010081>
- Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E. L., Irie, Y., ... Bjarnsholt, T. (2016). Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *mBio*, 7(2), e00237-16-. <http://doi.org/10.1128/mBio.00237-16>

- Kramer, V. J., Etterson, M. A., Hecker, M., Murphy, C. A., Roesijadi, G., Spade, D. J., ... Ankley, G. T. (2011). Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: bridging to population-level effects. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 30(1), 64–76. <http://doi.org/10.1002/etc.375>
- Kropotkin, P. (1902). Mutual aid among animals. In *Mutual Aid: A Factor of Evolution* (Heinemann, p. p13). United Kindom.
- Krützen, M., Mann, J., Heithaus, M. R., Connor, R. C., Bejder, L., & Sherwin, W. B. (2005). Cultural transmission of tool use in bottlenose dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8939–43. <http://doi.org/10.1073/pnas.0500232102>
- Kurmayer, R., & Christiansen, G. (2009). The Genetic Basis of Toxin Production in Cyanobacteria. *Freshwater Reviews*, 2(1), 31–50. <http://doi.org/10.1608/FRJ-2.1.2>
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Fastner, J., & Borner, T. (2004). Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology*, 6(8), 831–841. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00626.x>
- Kutschera, U. (2009). Charles Darwin's Origin of Species, directional selection, and the evolutionary sciences today. *Naturwissenschaften*, 96(11), 1247–1263. <http://doi.org/10.1007/s00114-009-0603-0>
- Kuyucak, N., & Volesky, B. (1988). Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnology Letters*, 10(2), 137–142. <http://doi.org/10.1007/BF01024641>
- Lage, C. A. S., Dalmaso, G. Z. L., Teixeira, L. C. R. S., Bendia, A. G., Paulino-Lima, I. G., Galante, D., ... West, R. (2012). Mini-Review: Probing the limits of extremophilic life in extraterrestrial environment-simulated experiments. *International Journal of Astrobiology*, 11(4), 251–256. <http://doi.org/10.1017/S1473550412000316>
- Lam, P. W., & Salit, I. E. (2014). *Raoultella planticola* bacteremia following consumption of seafood. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Medicale*, 25(4), e83-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25285133>
- Langham, R. J., Syme, G. J., & Syme, L. A. (1975). Voluntary lithium intake, "Antidotal Thirst"; and current behaviour of rats. *British Journal of Pharmacology*, 55(3), 409–413. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1975.tb06945.x>
- Lankau, R., Jørgensen, P., & Harris, D. (2011). Incorporating evolutionary principles into environmental management and policy. *Evolutionary*, 4(2), 315–325. <http://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00171.x/full>
- Larsson, K., Hajdu, S., Kilpi, M., Larsson, R., Leito, A., & Lyngs, P. (2014). Effects of an extensive *Prymnesium polylepis* bloom on breeding eiders in the Baltic Sea. *Journal of Sea Research*, 88, 21–28. <http://doi.org/10.1016/j.seares.2013.12.017>
- Lavergne, S., Mouquet, N., & Thuiller, W. (2010). Biodiversity and climate change: integrating evolutionary and ecological responses of species and communities.

*Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 321–350.  
<http://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144628>

- Lavoie, M., Sabatier, S., Garnier-Laplace, J., & Fortin, C. (2014). Uranium accumulation and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is modulated by pH. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 33(6), 1372–9. <http://doi.org/10.1002/etc.2565>
- Leakey, R. E., & Lewin, R. (1997). The Sixth Extinction: Patterns of Life and the Future of Humankind. *Journal of Leisure Research*, 29(4), 476.
- Leakey, R., & Lewin, R. (1996). *The sixth extinction: biodiversity and its survival*. Phoenix.
- Ledin, M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*, 51(1), 1–31.  
[http://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00008-8](http://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00008-8)
- Lee, C. E., Remfert, J. L., & Chang, Y.-M. (2007). Response to selection and evolvability of invasive populations. *Genetica*, 129(2), 179–192.  
<http://doi.org/10.1007/s10709-006-9013-9>
- Lee, H., Popodi, E., Tang, H., & Foster, P. L. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), E2774–83.  
<http://doi.org/10.1073/pnas.1210309109>
- Lee, J. W., Kim, H. U., Choi, S., Yi, J., & Lee, S. Y. (2011). Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 758–767. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.011>
- Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16(10), 2091–102. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- Lemes, G. A. F., Kersanach, R., da S. Pinto, L., Dellagostin, O. A., Yunes, J. S., & Matthiensen, A. (2008). Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 358–365. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.03.013>
- Lenski, R. (2011). Evolution in Action: a 50,000-Generation Salute to Charles Darwin. *Microbe*, 6(616), 30–33.
- Lenski, R., & Travisano, M. (1994). Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 6808–6814.
- Lepot, K., Benzerara, K., Brown, G. E., & Philippot, P. (2008). Microbially influenced formation of 2,724-million-year-old stromatolites. *Nature Geoscience*, 1(2), 118–121. <http://doi.org/10.1038/ngeo107>
- Levin, B. R., Perrot, V., & Walker, N. (2000). Compensatory Mutations, Antibiotic Resistance and the Population Genetics of Adaptive Evolution in Bacteria. *Genetics*, 154(3), 985–997.



- Lewandowska, A. M., Hillebrand, H., Lengfellner, K., & Sommer, U. (2014). Temperature effects on phytoplankton diversity — The zooplankton link. *Journal of Sea Research*, 85, 359–364. <http://doi.org/10.1016/j.seares.2013.07.003>
- Lewis, S. L., & Maslin, M. A. (2015). Defining the Anthropocene. *Nature*, 519(7542), 171–180. <http://doi.org/10.1038/nature14258>
- Lewontin, R. C., Rose, S. P. R., Rose, S., & Kamin, L. J. (1985). *Not in our genes: biology, ideology, and human nature*. Michigan: Pantheon Books.
- Li, P.-F., Mao, Z.-Y., Rao, X.-J., Wang, X.-M., Min, M.-Z., Qiu, L.-W., & Liu, Z.-L. (2004). Biosorption of uranium by lake-harvested biomass from a cyanobacterium bloom. *Bioresource Technology*, 94(2), 193–195. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.024>
- Li, X., Hu, H., Yu, J., & Zhao, W. (2016). Selection of Suitable Microalgal Species for Sorption of Uranium in Radioactive Wastewater Treatment. *Huan Jing Ke Xue= Huanjing Kexue / [Bian Ji, Zhongguo Ke Xue Yuan Huan Jing Ke Xue Wei Yuan hui “Huan Jing Ke Xue” bian Ji Wei Yuan Hui.]*, 37(5), 1858–63.
- Litchman, E., Klausmeier, C. A., Miller, J. R., Schofield, O. M., & Falkowski, P. G. (2006). Multi-nutrient, multi-group model of present and future oceanic phytoplankton communities. *Biogeosciences Discussions*, 3, 607–663. <http://doi.org/10.5194/bgd-3-607-2006>
- Liu, H., & Wu, J. (1993). Uptake and recovery of americium and uranium by *Anacystis* biomass. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 28(2), 491–504. <http://doi.org/10.1080/10934529309375890>
- Lopez-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L., Larrauri, A., Martín-Otero, L., & Costas, E. (2001). Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology*, 36(2), 179–190. <http://doi.org/10.1080/09670260110001735328>
- López-Rodas, V., Costas, E., Bañares, E., García-Villada, L., Altamirano, M., Rico, M., ... Flores-Moya, A. (2006). Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 2. Microcystin net production, photosynthesis and respiration. *Phycologia*, 45(3), 243–248. <http://doi.org/10.2216/04-31.1>
- López-Rodas, V., Costas, E., Maneiro, E., Marvá, F., Rouco, M., Delgado, A., & Flores-Moya, A. (2009). Living in Vulcan’s forge: Algal adaptation to stressful geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as a result of pre-selective mutations. *Phycological Research*, 57(2), 111–117. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2009.00527.x>
- López-Rodas, V., Maneiro, E., & Costas, E. (2006). Adaptation of cyanobacteria and microalgae to extreme environmental changes derived from anthropogenic pollution. *Limnetica*, 25, 403–410.
- López-Rodas, V., Marvá, F., Costas, E., & Flores-Moya, A. (2008). Microalgal adaptation to a stressful environment (acidic, metal-rich mine waters) could be due to selection of pre-selective mutants originating in non-extreme environments. *Environmental and Experimental Botany*, 64(1), 43–48.

<http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.01.001>

- López-Rodas, V., Marv, F., Rouco, M., Costas, E., & Flores-Moya, A. (2008). Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to stressful acidic, mine metal-rich waters as result of pre-selective mutations. *Chemosphere*, 72(5), 703–7. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.009>
- López-Rodas, V., Rouco, M., Sánchez-Fortn, S., Flores-Moya, A., & Costas, E. (2011). Genetic adaptation and acclimation of phytoplankton a stress gradient in the extreme waters of the Agrio River-Caviahue Lake (Argentina). *Journal of Phycology*, 47(5), 1036–1043. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01035.x>
- Losos, J. B., Schoener, T. W., Warheit, K. I., & Creer, D. (2001). Experimental studies of adaptive differentiation in Bahamian *Anolis* lizards. *Genetica*, 112–113, 399–415.
- Lovelock, J. (2000). *Gaia: A new look at life on earth*. Oxford.
- Luncz, L. V., & Boesch, C. (2014). Tradition over trend: Neighboring chimpanzee communities maintain differences in cultural behavior despite frequent immigration of adult females. *American Journal of Primatology*, 76(7), 649–657. <http://doi.org/10.1002/ajp.22259>
- Lundberg, G., Kottelat, M., Smith, G. R., Stiassny, M. L. J., & Gill, A. C. (2000). So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, (87), 26–62.
- Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*, 28(6), 491–511.
- Luttrell, W. E., & Giles, C. B. (2007). Toxic Tips: Osmium tetroxide. *Journal of Chemical Health and Safety*, 14(5), 40–41.
- MacDonald, D., Kagel, J., & Battalio, R. (1991). Animals’ choices over uncertain outcomes: Further experimental results. *The Economic Journal*. <http://doi.org/10.2307/2234427>
- Mackey, K. R. M., Paytan, A., Caldeira, K., Grossman, A. R., Moran, D., McIlvin, M., & Saito, M. A. (2013). Effect of temperature on photosynthesis and growth in marine *Synechococcus* spp. *Plant Physiology*, 163(2), 815–29. <http://doi.org/10.1104/pp.113.221937>
- MacKintosh, C., Beattie, K., Klumpp, S., & Cohen, P. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS*, 264(2), 187–192. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80245-E](http://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80245-E)
- Mann, D. G. (1999). The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38(6), 437–495. <http://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-6-437.1>
- Mann, H., & Fyfe, W. S. (1984). An experimental study of algal uptake of U, Ba, V, Co and Ni from dilute solutions. *Chemical Geology*, 44(4), 385–398. [http://doi.org/10.1016/0009-2541\(84\)90150-5](http://doi.org/10.1016/0009-2541(84)90150-5)
- Mannion, A. M. (1993). Biotechnology and global change. *Global Environmental Change*, 3(4), 320–329. [http://doi.org/10.1016/0959-3780\(93\)90021-C](http://doi.org/10.1016/0959-3780(93)90021-C)

- Margalef, R. (1955). *Los organismos indicadores en la limnología*. Madrid: Ministerio de Agricultura Dirección General de Montes Caza y Pesca Fluvial Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73–83. <http://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Margulis, L., & Sagan, D. (1995). *What is life?* Berkeley: University of California Press.
- Margulis, L., & Schwartz, K. (1982). *Five Kingdoms. An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*. (W.H.Freema). San Francisco.
- Markich, S. J. (2002). Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *TheScientificWorldJournal*, 2, 707–29. <http://doi.org/10.1100/tsw.2002.130>
- Marqués, A., Roca, X., Simon-Pujol, M. D., Fuste, M. C., & Congregado, F. (1991). Uranium accumulation by *Pseudomonas* sp. EPS-5028. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(3), 406–410. <http://doi.org/10.1007/BF00172734>
- Marshall, A. (1920). *Principles of Economics* (Revised e.). London: Macmillan.
- Matson, C. W., Lambert, M. M., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Donnelly, K. C., Islamzadeh, A., ... Bickham, J. W. (2006). Evolutionary toxicology: population-level effects of chronic contaminant exposure on the marsh frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environmental Health Perspectives*, 114(4), 547–52.
- Maynard, S. J. (1974). *Models in ecology* (Cambridge). Cambridge.
- Maynard Smith, J. (1982). *Evolution and the theory of games*. Cambridge ;;New York: Cambridge University Press.
- Maynard Smith, J., & Szathmary, E. (1995). The Major Transitions in Evolution. *Oxford University Press*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. (Columbia U). New York.
- Mayr, E. (1958). Behavior and systematics. In A. Roe & G. G. Simpson (Eds.), *Behavior and Evolution*. New Haven: Yale University Press.
- McAllister, D. E., Hamilton, A. L., & Harvey, B. (1997). Global freshwater biodiversity : striving for the integrity of freshwater ecosystems. *Sea Wind : Bulletin of Ocean Voice International*, 11(3).
- McCready, R. G. L., & Lakshamanan, V. I. (1986). Review of bioadsorption research to recover uranium from leach solutions in Canada. In S. Eccles (Ed.), *Immobilisation of ions by bio-sorption* (pp. 219–225). Ottawa, Canada.
- McGhee, G. R. (2011). *Convergent evolution : limited forms most beautiful*. MIT Press. <http://doi.org/10.7551/mitpress/9780262016421.001.0001>
- McKee, J. K., Sciulli, P. W., Fooce, C. D., & Waite, T. A. (2004). Forecasting global biodiversity threats associated with human population growth. *Biological Conservation* (Vol. 115). [http://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00099-5](http://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00099-5)

- Meehl, G. A., Stocker, T. F., Collins, W. D., Friedlingstein, A. T., Gaye, A. T., Gregory, J. M., ... Zhao, Z. (2007). Global Climate Projections. In S. Solomon, D. Qin, M. Manning, M. Marquis, K. Averyt, H. J. Tignor, M. M. B., Miller, & Z. Chen (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 747–845). Cambridge University Press.
- Mehdiabadi, N. J., Jack, C. N., Farnham, T. T., Platt, T. G., Kalla, S. E., Shaulsky, G., ... Strassmann, J. E. (2006). Social evolution: Kin preference in a social microbe. *Nature*, 442(7105), 881–882. <http://doi.org/10.1038/442881a>
- Mehdiabadi, N. J., Kronforst, M. R., Queller, D. C., & Strassmann, J. E. (2009). Phylogeny, reproductive isolation and kin recognition in the social amoeba *Dictyostelium purpureum*. *Evolution*, 63(2), 542–548. <http://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00574.x>
- Michod, R. E. (2000). *Darwinian dynamics : evolutionary transitions in fitness and individuality*. Princeton University Press.
- Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O. M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T. M., ... Jakobsen, K. S. (2003). Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2774–85. <http://doi.org/10.1128/JB.185.9.2774-2785.2003>
- Miller, D. J., & Technau, U. (2010). Understanding the evolution of multicellularity: insights from basal metazoans. *BioEssays*, 32(2), 175–178. <http://doi.org/10.1002/bies.200900168>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Miller, S. L. (1953). A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions. *Science*, 117(3046), 528–529. <http://doi.org/10.1126/science.117.3046.528>
- Miller, S. L., & Urey, H. C. (1959). Organic Compound Synthes on the Primitive Eart. *Science*, 130(3370), 245–251. <http://doi.org/10.1126/science.130.3370.245>
- Minillo, A., Freitas, S. C. de, Isique, W. D., Prado, H. F. A. Do, Dimitrov, M. R., Paixão, D. A. A., ... Tangerino, E. P. (2013). Biodegradação da hepatotoxina(D-Leu1)-microcistina-LR por bactérias presentes em filtros biológicos de carvão. *Engenharia Sanitaria E Ambiental*, 18(3), 205–214. <http://doi.org/10.1590/S1413-41522013000300003>
- Mitchell, A., Romano, G. H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., ... Pilpel, Y. (2009). Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature*, 460(7252), 220–224. <http://doi.org/10.1038/nature08112>
- Mojzsis, S., Arrhenius, G., McKeegan, K., & Harrison, T. (1996). Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Letters to Nature*, 384, 55–59. <http://doi.org/10.1038/384055a0>
- Monod, J. (1974). On Chance and Necessity. In *Studies in the Philosophy of Ciology* (Macmillan, pp. 357–375). UK.
- Morán, X. A. G., López-Urrutia, Á., Calvo-Díaz, A., & Li, W. K. W. (2010). Increasing

- importance of small phytoplankton in a warmer ocean. *Global Change Biology*, 16(3), 1137–1144. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01960.x>
- Moulin, C., Decambox, P., & Mauchien, P. (1997). State of the art in time-resolved laser-induced fluorescence for actinides analysis: Applications and trends. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 226(1–2), 135–138. <http://doi.org/10.1007/BF02063637>
- Mullen, B. (1981). Sociobiology: a new synthesis? *Sociological Focus*. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00380237.1981.10570383>
- Muller, H. J. (1932). Some Genetic Aspects of Sex. *The American Naturalist*, 66(703), 118–138.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), 2–9. [http://doi.org/10.1016/0027-5107\(64\)90047-8](http://doi.org/10.1016/0027-5107(64)90047-8)
- Müren, U., Berglund, J., Samuelsson, K., & Andersson, A. (2005). Potential Effects of Elevated Sea-Water Temperature on Pelagic Food Webs. *Hydrobiologia*, 545(1), 153–166. <http://doi.org/10.1007/s10750-005-2742-4>
- Muschick, M., Indermaur, A., & Salzburger, W. (2012). Convergent evolution within an adaptive radiation of cichlid fishes. *Current Biology : CB*, 22(24), 2362–8. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.048>
- Myers, N., & Knoll, A. H. (2001). The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5389–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.091092498>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Fonseca, G. A. B., Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–8. <http://doi.org/10.1038/35002501>
- Nagy, B. (1993). Role of organic matter in the Proterozoic Oklo natural fission. *Geology*, 21(7), 655–658. [http://doi.org/10.1130/0091-7613\(1993\)021<0655:ROOMIT>2.3.CO;2](http://doi.org/10.1130/0091-7613(1993)021<0655:ROOMIT>2.3.CO;2)
- Nakajima, A., & Sakaguchi, T. (1986). Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 59–64. <http://doi.org/10.1007/BF00266286>
- Nancharaiyah, Y. . V., Joshi, H. M., Mohan, T. V. K., & Narasimhan, V. P. Venugopalan, S. V. (2006). Aerobic granular biomass: a novel biomaterial for efficient uranium removal. *Current Science*, 91(4), 5503–509.
- Nash, J. (1950). Equilibrium points in n-person games. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.
- Niklas, K. J. (2014). The evolutionary-developmental origins of multicellularity. *American Journal of Botany*, 101(1), 6–25. <http://doi.org/10.3732/ajb.1300314>
- Niklas, K. J., & Newman, S. A. (2013). The origins of multicellular organisms. *Evolution & Development*, 15(1), 41–52. <http://doi.org/10.1111/ede.12013>
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., & Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *Journal of Biochemistry*, 126(3), 520–9. Retrieved from



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10467167>

- Noë, R. (2001). *Economics in Nature: Social Dilemmas, Mate Choice and Biological Markets*. (R. Nöe, J. A. R. A. M. van Hooff, & P. Hammerstein, Eds.). New York: Cambridge University Press.
- Norman R. Pace, E. F. D. (2001). Environmental Diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology*, 50(4), 470–478. <http://doi.org/10.1080/10635150118513>
- Novacek, M. J. (2001). *The Biodiversity Crisis Losing What Counts*. The New Press.
- Nowak, M. A. (2006). Five rules for the evolution of cooperation. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5805), 1560–3. <http://doi.org/10.1126/science.1133755>
- Nowak, M. A., & Sigmund, K. (1998). Evolution of indirect reciprocity by image scoring. *Nature*, 393(6685), 573–7. <http://doi.org/10.1038/31225>
- Nowak, M. A., & Sigmund, K. (2005). Evolution of indirect reciprocity. *Nature*, 437(7063), 1291–8. <http://doi.org/10.1038/nature04131>
- Nowicki, B., Rhen, M., Vaisanen-Rhen, V., Pere, A., Korhonen, & T. K. (1985). Organization of Fimbriate Cells in Colonies of Escherichia coli Strain 3040. *Microbiology*, 131(5), 1263–1266. <http://doi.org/10.1099/00221287-131-5-1263>
- Nozaki, H., Misawa, K., Kajita, T., Kato, M., Nohara, S., & Watanabe, M. M. (2000). Origin and Evolution of the Colonial Volvocales (Chlorophyceae) as Inferred from Multiple, Chloroplast Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17(2), 256–268. <http://doi.org/10.1006/mpev.2000.0831>
- Nuclear Energy Institute. (2016). World Statistics-Nuclear Energy Around the World. Retrieved from <http://www.nei.org/Knowledge-Center/Nuclear-Statistics/World-Statistics>
- Nunney, L. (1999). Lineage selection and the evolution of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1418), 493–498. <http://doi.org/10.1098/rspb.1999.0664>
- Nurse, P., & Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Genetics*, 96(3), 627–37.
- O'Connor, M. I., Piehler, M. F., Leech, D. M., Anton, A., Bruno, J. F., Field, C. B., ... Parmesan, C. (2009). Warming and Resource Availability Shift Food Web Structure and Metabolism. *PLoS Biology*, 7(8), e1000178. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000178>
- Oberholster, P., Botha, A.-M., & Grobbelaar, J. (2003). Microcystis aeruginosa: source of toxic microcystins in drinking water. *African Journal of Biotechnology*, 3(3), 159–168. <http://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2029>
- OECD 201. (1984). *Algal Growth Inhibition test. guideline for testing chemicals 201*. Paris.
- OECD 201. (2012). *OECD guidelines for the testing of chemicals-Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test*.
- Ohtake, A., Shirai, M., Aida, T., Mori, N., Harada, K., Matsuura, K., ... Nakano, M. (1989). Toxicity of Microcystis species isolated from natural blooms and

- purification of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3202–7.
- Omar, N. B., Merroun, M. L., González-Muñoz, M. T., & Arias, J. M. (1996). Brewery yeast as a biosorbent for uranium. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(3), 283–287. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb04330.x>
- OMS. (2013). OMS | Guías para la calidad del agua potable, tercera edición. WHO.
- ONU. (2010). Decenio Internacional para la Acción “El agua, fuente de vida” 2005-2015. Áreas temáticas: Derecho humano al agua y al saneamiento.
- Orgogozo, V. (2015). Replaying the tape of life in the twenty-first century. *Interface Focus*, 5(6). <http://doi.org/10.1098/rsfs.2015.0057>
- Orr, H. A., & Unckless, R. L. (2014). The population genetics of evolutionary rescue. *PLoS Genetics*, 10(8), e1004551. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004551>
- Paasche, E. (2001). A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia*, 40(6), 503–529. <http://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-6-503.1>
- Palmer, A. R. (2012). Developmental Plasticity and the Origin of Novel Forms: Unveiling Cryptic Genetic Variation Via “Use and Disuse.” *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 318(6), 466–479. <http://doi.org/10.1002/jez.b.21447>
- Palumbi, S. R. (2001). Humans as the world’s greatest evolutionary force. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5536), 1786–90. <http://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>
- Panak, P. J., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Geipel, G., Bernhard, G., & Nitsche, H. (2000). Complex formation of U(VI) with *Bacillus-isolae* from a uranium mining waste pile. *Radiochimica Acta*, 88(2). <http://doi.org/10.1524/ract.2000.88.2.071>
- Pang, C., Liu, Y.-H., Cao, X.-H., Li, M., Huang, G.-L., Hua, R., ... An, X.-F. (2011). Biosorption of uranium(VI) from aqueous solution by dead fungal biomass of *Penicillium citrinum*. *Chemical Engineering Journal*, 170(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2010.10.068>
- Parekh, S., Vinci, V. A., & Strobel, R. J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 287–301. <http://doi.org/10.1080/10826068.2012.759969>
- Partensky, F., Hess, W. R., & Vaulot, D. (1999). Prochlorococcus, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(1), 106–27.
- Pasteur, L. (1885). Observations relatives à la note précédente de M. Duclaux. *CR Acad Sci (Paris)*, 100, 68.
- Patterson, C., Tilton, G., & Inghram, M. (1955). Age of Earth. *Science*, 212, 69–75.
- Payne, J. L., Boyer, A. G., Brown, J. H., Finnegan, S., Kowalewski, M., Krause, R. A., ... Wang, S. C. (2009). Two-phase increase in the maximum size of life over 3.5 billion years reflects biological innovation and environmental opportunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

106(1), 24–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0806314106>

- Pennington, J. T., Mahoney, K. L., Kuwahara, V. S., Kolber, D. D., Calienes, R., & Chavez, F. P. (2006). Primary production in the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography*, 69(2), 285–317. <http://doi.org/10.1016/j.pocean.2006.03.012>
- Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J.-M., Basile, I., ... Stievenard, M. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399(6735), 429–436. <http://doi.org/10.1038/20859>
- Pincheira Donoso, D. (2012). Evolución Adaptativa y Métodos Comparativos Filogenéticos. In *Selección y Evolución Adaptativa: Fundamentos Teóricos y Empíricos Desde La Perspectiva De Los Lagartos* (1st ed., pp. 93–114). Ediciones UC.
- Platt, M. L., & Glimcher, P. W. (1999). Neural correlates of decision variables in parietal cortex. *Nature*, 400(6741), 233–238. <http://doi.org/10.1038/22268>
- Pomati, F., & Nizzetto, L. (2013). Assessing triclosan-induced ecological and trans-generational effects in natural phytoplankton communities: a trait-based field method. *Ecotoxicology (London, England)*, 22(5), 779–94. <http://doi.org/10.1007/s10646-013-1068-7>
- Pouria, S., Andrade, A. de, Barbosa, J., & Cavalcanti, R. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 352(9121), 21–26. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12285-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12285-1)
- Powell, R. (2012). Convergent evolution and the limits of natural selection. *European Journal for Philosophy of Science*, 2(3), 355–373. <http://doi.org/10.1007/s13194-012-0047-9>
- Powner, M. W., Gerland, B., & Sutherland, J. D. (2009). Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature*, 459(7244), 239–242. <http://doi.org/10.1038/nature08013>
- Premadas, A., & Srivastava, P. K. (1999). Rapid laser fluorometric method for the determination of uranium in soil, ultrabasic rock, plant ash, coal fly ash and red mud samples. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 242(1), 23–27. <http://doi.org/10.1007/BF02345890>
- Pribil, S., & Marvan, P. (1976). Accumulation of uranium by the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda*. *Arch. Hydrobiol.(Suppl.)*, 49(2), 214–225.
- Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H., & Heller, C. (2001). *Life, the science of biology. The Science of Biology*.
- Rademacher, L. K., Lundstrom, C. C., Johnson, T. M., Sanford, R. A., Zhao, J., & Zhao, Z. (2006). Experimentally Determined Uranium Isotope Fractionation During Reduction of Hexavalent U by Bacteria and Zero Valent Iron. *Environmental Science and Technology*, 40(22), 6943–6948. <http://doi.org/10.1021/ES0604360>
- Rai, L. C., Gaur, J. P., & Kumar, H. D. (1981). Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Reviews*, 56(2), 99–151. <http://doi.org/10.1111/j.1469->



185X.1981.tb00345.x

- Rainey, P. B., & Rainey, K. (2003). Evolution of cooperation and conflict in experimental bacterial populations. *Nature*, 425(6953), 72–74. <http://doi.org/10.1038/nature01906>
- Rainey, P. B., & Travisano, M. (1998). Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, 394(6688), 69–72. <http://doi.org/10.1038/27900>
- Ralph, P. J., Schreiber, U., Gademann, R., Köhl, M., & Larkum, A. W. D. (2005). Coral Photobiology Studied With a New Imaging Pulse Amplitude Modulated Fluorometer1. *Journal of Phycology*, 41(2), 335–342. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04034.x>
- Rampelotto, P. H. (2016). *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges*. Springer.
- Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., & Sivonen, K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 568–73. <http://doi.org/10.1073/pnas.0304489101>
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., & Sivonen, K. (2006). Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (mcyE) PCR and associations with environmental factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6101–10. <http://doi.org/10.1128/AEM.01058-06>
- Rasmussen, B., Fletcher, I. R., Brocks, J. J., & Kilburn, M. R. (2008). Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature*, 455(7216), 1101–1104. <http://doi.org/10.1038/nature07381>
- Ratcliff, W. C., Denison, R. F., Borrello, M., & Travisano, M. (2012). Experimental evolution of multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), 1595–600. <http://doi.org/10.1073/pnas.1115323109>
- Ratcliff, W. C., Fankhauser, J. D., Rogers, D. W., Greig, D., & Travisano, M. (2015). Origins of multicellular evolvability in snowflake yeast. *Nature Communications*, 6, 6102. <http://doi.org/10.1038/ncomms7102>
- Ratcliff, W. C., Herron, M. D., Howell, K., Pentz, J. T., Rosenzweig, F., Travisano, M., ... Watanabe, M. M. (2013). Experimental evolution of an alternating uni- and multicellular life cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Communications*, 4, 607–645. <http://doi.org/10.1038/ncomms3742>
- Raup, D. M., & Sepkoski, J. J. (1982). Mass Extinctions in the Marine Fossil Record. *Science, New Series*, 215(19), 1501–1503.
- Raup, D. M., & Sepkoski, J. J. (1982). Mass extinctions in the marine fossil record. *Science (New York, N.Y.)*, 215(4539), 1501–3. <http://doi.org/10.1126/science.215.4539.1501>
- Reboud, X., & Graham, B. (1997). Experimental evolution in *Chlamydomonas*. III. Evolution of specialist and generalist types in environments that vary in space and

- time. *Heredity*, 78, 507–514. <http://doi.org/10.1038/hdy.1997.79>
- Reed, T. E., Waples, R. S., Schindler, D. E., Hard, J. J., & Kinnison, M. T. (2010). Phenotypic plasticity and population viability: the importance of environmental predictability. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1699), 3391–3400. <http://doi.org/10.1098/rspb.2010.0771>
- Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L.-V., & Woo, K. C. (1995). Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology*, 7(6), 595–602. <http://doi.org/10.1007/BF00003948>
- Reuman, D., & Holt, R. (2014). A metabolic perspective on competition and body size reductions with warming. *Journal of Animal*, 83, 59–69. <http://doi.org/10.1111/1365-2656.12064>
- Reusch, T. B. H., & Boyd, P. W. (2013). Experimental evolution meets marine phytoplankton. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 67(7), 1849–59. <http://doi.org/10.1111/evo.12035>
- Reznick, D. A., Bryga, H., & Endler, J. A. (1990). Experimentally induced life-history evolution in a natural population. *Nature*, 346(6282), 357–359. <http://doi.org/10.1038/346357a0>
- Rhodes, J. S., & Kawecki, T. J. (2009). Behavior and Neurobiology. In J. T. Garland & M. R. Rose (Eds.), *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications of Selection Experiments* (pp. 263–300). University of California.
- Riordan, C., Bustard, M., Putt, R., & McHale, A. P. (1997). Removal of uranium from solution using residual brewery yeast: combined biosorption and precipitation. *Biotechnology Letters*, 19(4), 385–388. <http://doi.org/10.1023/A:1018367304767>
- Robinson, G. E. (2004). Genomics: Beyond Nature and Nurture. *Science*, 304(5669), 397–399. <http://doi.org/10.1126/science.1095766>
- Rohrback, T., Henning, M., & Kohl, J.-G. (1999). Does the toxic effect of *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia galeata* depend on microcystin ingestion rate? *Fundamental and Applied Limnology*, 146(4), 385–395. <http://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/146/1999/385>
- Rokas, A. (2008). The origins of multicellularity and the early history of the genetic toolkit for animal development. *Annual Review of Genetics*, 42, 235–51. <http://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091513>
- Rost, B., Zondervan, I., & Wolf-Gladrow, D. (2008). Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Marine Ecology Progress Series*, 373237(227), 227–237. <http://doi.org/10.3354/meps07776>
- Roth, E. (1977). The discovery and study of the nuclear reactor in oklo e. roth, 37, 65–78.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092–1101. <http://doi.org/10.1038/35059215>

- Rouco, M., López-Rodas, V., Flores-Moya, A., & Costas, E. (2011). Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Microbial Ecology*, 62(2), 265–73. <http://doi.org/10.1007/s00248-011-9804-0>
- Rousell, D., Barnett, R., Bayne, S., Bogost, I., Brew, A., CARMICHAEL, P., ... Crutzen, P. (2016). Dwelling in the Anthropocene: Reimagining University Learning Environments in Response to Social and Ecological Change. *Australian Journal of Environmental Education*, 32(2), 137–153. <http://doi.org/10.1017/ae.2015.50>
- Ruby, E. G. (1996). Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: The *Vibrio fischeri*–*Euprymna scolopes* Light Organ Symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 591–624. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.591>
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., ... Yoder, M. (2015). A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLOS ONE*, 10(4), e0119248. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- Sachs, J., Mueller, U., Wilcox, T., & Bull, J. (2004). The evolution of cooperation. *The Quarterly Review of Biology*, 79(2), 135–60. <http://doi.org/10.1086/383541>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 255–74.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–91.
- Sakaguchi, T., & Nakajima, A. (1991). Accumulation of heavy metals such as uranium and thorium by microorganisms. In R. W. Smith & M. Misra (Eds.), *Mineral Bioprocessing*. The Minerals, Metals and Materials Society.
- Samuelson, L. (2002). Evolution and Game Theory. *Journal of Economic Perspectives*, 16(2), 47–66. <http://doi.org/10.1257/0895330027256>
- Sandau, E., Sandau, P., & Pulz, O. (1996). Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnologica*, 16(4), 227–235. <http://doi.org/10.1002/abio.370160402>
- Sar, P., K. Kazy, S., & D'Souza, S. F. (2004). Radionuclide remediation using a bacterial biosorbent. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(2), 193–202. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.05.004>
- Scheffer, M., Carpenter, S., Foley, J. A., Folke, C., & Walker, B. (2001). Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, 413(6856), 591–596. <http://doi.org/10.1038/35098000>
- Scheffer, M., Rinaldi, S., Huisman, J., & Weissing, F. J. (2003). Why plankton communities have no equilibrium: solutions to the paradox. *Hydrobiologia*, 491(1–3), 9–18. <http://doi.org/10.1023/A:1024404804748>
- Schiermeier, Q. (2010a). Ocean greenery under warming stress. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/news.2010.379>
- Schiermeier, Q. (2010b). The real holes in climate science. *Nature*, 463(7279), 284–7. <http://doi.org/10.1038/463284a>

- Schirrmeister, B. E., Gugger, M., & Donoghue, P. C. J. (2015). Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology*, 58(5), 769–785. <http://doi.org/10.1111/pala.12178>
- Schopf, J., & Packer, B. (1987). Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science*, 237(4810).
- Schopf, J. W. (1993). Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science (New York, N.Y.)*, 260, 640–6. <http://doi.org/10.1126/science.260.5108.640>
- Senior, B. (1977). The Dienes phenomenon: identification of the determinants of compatibility. *Microbiology*, 102(2), 235–244.
- Servedio, M. R., Brandvain, Y., Dhole, S., Fitzpatrick, C. L., Goldberg, E. E., Stern, C. A., ... Wilkinson, G. (2014). Not Just a Theory—The Utility of Mathematical Models in Evolutionary Biology. *PLoS Biology*, 12(12), e1002017. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002017>
- Shapiro, J. (1988). Bacteria as multicellular organisms. *Scientific American*, 258(6), 82–89.
- Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*, 52(1), 81–104. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.81>
- Sheppard, S. C., Sheppard, M. I., Gallerand, M.-O., & Sanipelli, B. (2005). Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 79(1), 55–83. <http://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.05.015>
- Shimkets, L. J. (1990). Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews*, 54(4), 473–501. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1708086>
- Shimkets, L. J. (1999). Intercellular Signaling During Fruiting-Body Development of *Myxococcus xanthus*. *Annual Review of Microbiology*, 53(1), 525–549. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.525>
- Sia, C. S., Wilson, S., Ananda-Rajah, M., Mills, J., & Aung, A. K. (2016). Refractory raoultella planticola peritonitis in an HIV positive patient. *Nephrology*, 21(11), 979–980. <http://doi.org/10.1111/nep.12705>
- Silberberg, A., Warren-Boulton, F. R., & Asano, T. (1987). Inferior-good and Giffen-good effects in monkey choice behavior. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 13(3), 292–301.
- Simberloff, D. (1996). *Extinction Rates*. (J. H. Lawton & R. M. May, Eds.), *Journal of Evolutionary Biology* (Vol. 9). Oxford: Oxford University Press. <http://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1996.t01-1-9010124.x>
- Simon, N., Cras, A.-L., Foulon, E., & Lemée, R. (2009). Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Comptes Rendus Biologies*, 332(2–3), 159–70. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2008.09.009>
- Simpson, G. G. (1944). *Tempo and Mode in Evolution*. Columbia University Press.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., &

- Greenberg, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407(6805), 762–764.  
<http://doi.org/10.1038/35037627>
- Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431–444.  
<http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Sivakumar, G., Xu, J., Thompson, R. W., Yang, Y., Randol-Smith, P., & Weathers, P. J. (2012). Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. *Bioresource Technology*, 107, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.091>
- Sivonen, K., & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In I. Chorus & J. Bartram (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management* (pp. 41–111). London.
- Sleep, N. H. (2001). Biogeochemistry: Oxygenating the atmosphere. *Nature*, 410(6826), 317–319. <http://doi.org/10.1038/35066664>
- Slutsky, E. E. (1915). Sulla teoria del bilancio del consumatore. *Giornale Degli Economisti*, 51(July), 1–26.
- Smienk, H. G. F., Sevilla Mur, E., Peleato, M. L., Razquin, P., & Mata, L. (2007). Validación de un kit para la detección de microcistinas en agua. *Alimentaria: Revista de Tecnología E Higiene de Los Alimentos*, (385), 104–111.
- Smith, D. (1978). Lead poisoning and the fall of Rome. *J. Chem. Educ*, 55(5), 334.  
<http://doi.org/10.1021/ed055p334.3>
- Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., ... Olson, M. V. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22), 8487–92.  
<http://doi.org/10.1073/pnas.0602138103>
- Smith, J. (1979). Game theory and the evolution of behaviour. *Proceedings of the Royal Society of London*, 205(1161), 475–488.
- Smith, J. M., & Price, G. R. (1973). The Logic of Animal Conflict. *Nature*, 246(5427), 15–18. <http://doi.org/10.1038/246015a0>
- Sorrosa, J. M., Satoh, M., & Shiraiwa, Y. (2005). Low Temperature Stimulates Cell Enlargement and Intracellular Calcification of Coccolithophorids. *Marine Biotechnology*, 7(2), 128–133. <http://doi.org/10.1007/s10126-004-0478-1>
- Spiegel, U. (1994). The Case of a “Giffen Good.” *The Journal of Economic Education*, 25(2), 137–147. <http://doi.org/10.1080/00220485.1994.10844823>
- Spiers, A. J. (2014). A mechanistic explanation linking adaptive mutation, niche change, and fitness advantage for the wrinkly spreader. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2014, 675432. <http://doi.org/10.1155/2014/675432>
- Spiers, A. J., Kahn, S. G., Bohannon, J., Travisano, M., & Rainey, P. B. (2002). Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics*, 161(1), 33–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019221>



- Stanley, S. M. (1973). Estimates of the magnitudes of major marine mass extinctions in earth history. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(5), 1486–9. <http://doi.org/10.1073/PNAS.1613094113>
- Stanley, S. M., Yang, X., Bender, M. L., Gingerich, P. D., Gould, S., Haldane, J. B. S., ... Valen, L. Van. (1987). Approximate evolutionary stasis for bivalve morphology over millions of years: a multivariate, multilinesage study. *Paleobiology*, 13(2), 113–139. <http://doi.org/10.1017/S009483730000868X>
- Stebbins, G. L., & Hill, G. J. C. (1980). Did Multicellular Plants Invade the Land? *The American Naturalist*, 115(3), 342–353. <http://doi.org/10.1086/283565>
- Steffen, W., Persson, A., Deutsch, L., Zalasiewicz, J., Williams, M., Richardson, K., ... Svedin, U. (2011). The anthropocene: from global change to planetary stewardship. *Ambio*, 40(7), 739–61. <http://doi.org/10.1007/s13280-011-0185-x>
- Steinberg, C. E. W., Schäfer, H., & Beisker, W. (1998). Do Acid-tolerant Cyanobacteria Exist? *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 26(1), 13–19. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-401X\(199801\)26:1<13::AID-AHEH13>3.0.CO;2-V](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-401X(199801)26:1<13::AID-AHEH13>3.0.CO;2-V)
- Stephens, D., & Krebs, J. (1986). *Foraging theory*. Princeton University Press.
- Stewart, I., Seawright, A. A., & Shaw, G. R. (2008). Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. In *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs* (pp. 613–637). New York, NY: Springer New York. [http://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7\\_28](http://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_28)
- Stigler, G. J. (1947). Notes on the History of the Giffen Paradox. *Journal of Political Economy*, 55(2), 152–156. <http://doi.org/10.1086/256487>
- Stiller, J. W., & Hall, B. D. (1997). The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4520–5.
- Stockwell, C. A., Hendry, A. P., & Kinnison, M. T. (2003). Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(2), 94–101. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00044-7](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00044-7)
- Stoecker, D. K., Hansen, P. J., Caron, D. A., & Mitra, A. (2017). Mixotrophy in the Marine Plankton. *Annual Review of Marine Science*, 9(1), 311–335. <http://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060617>
- Sturmbauer, C., Husemann, M., & Danley, P. D. (2011). Explosive Speciation and Adaptive Radiation of East African Cichlid Fishes. In *Biodiversity Hotspots* (pp. 333–362). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [http://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5\\_18](http://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_18)
- Stylo, M., Neubert, N., Wang, Y., Monga, N., Romaniello, S. J., Weyer, S., & Bernier-Latmani, R. (2015). Uranium isotopes fingerprint biotic reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5619–24. <http://doi.org/10.1073/pnas.1421841112>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., & Shin, K.-H. (2015). Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329–352. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>

- Suzuki, Y., & Takahashi, M. (1995). Growth responses of several diatoms isolated from various environments to temperature. *Journal of Phycology*, 31(6), 880–888. <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00880.x>
- Swallow, J. G., & Garland, T. (2005). Selection Experiments as a Tool in Evolutionary and Comparative Physiology: Insights into Complex Traits--an Introduction to the Symposium. *Integrative and Comparative Biology*, 45(3), 387–90. <http://doi.org/10.1093/icb/45.3.387>
- Takamura, N., Kasai, F., & Watanabe, M. (1989). Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *Journal of Applied Phycology*, 1(1), 39–52. <http://doi.org/10.1007/BF00003534>
- Takenaka, S., & Watanabe, M. F. (1997). Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 34(4), 749–57.
- Tenaillon, O., Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, R. L., McDonald, P., Bennett, A. F., Long, A. D., & Gaut, B. S. (2012). The molecular diversity of adaptive convergence. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6067), 457–61. <http://doi.org/10.1126/science.1212986>
- Thomas, M. K., Kremer, C. T., Klausmeier, C. A., & Litchman, E. (2012). A Global Pattern of Thermal Adaptation in Marine Phytoplankton. *Science*, 338(6110), 1085–1088. <http://doi.org/10.1126/science.1224836>
- Tillett, D., Parker, D. L., & Neilan, B. A. (2001). Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (mcyA) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2810–8. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2810-2818.2001>
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M., & Ohno, T. (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), 5442–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0600999103>
- Trainor, F. R. (1996). Reproduction in *Scenedesmus*. *ALGAE*, 11(2), 183–201.
- Travisano, M., & Lenski, R. E. (1996). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IV. Targets of selection and the specificity of adaptation. *Genetics*, 143(1), 15–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8722758>
- Travisano, M., Mongold, J. A., Bennett, A. F., & Lenski, R. E. (1995). Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5194), 87–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809610>
- TRI99. (2002). *Toxic Chemical Release Inventory. National Library of Medicine, National Toxicology Information Program, Bethesda, MD. TRI on-site and off-site releases (in pounds), all facilities (of 8) for releasing Beryllium, all industries.* Retrieved from <http://www.epa.gov/triexplorer/chemical.htm>.
- Trivers, R. (1971). The evolution of reciprocal altruism. *Quarterly Review of Biology*, 35–37. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2822435>

- Tsezos, M. (1983). The role of chitin in uranium adsorption by *R. arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(8), 2025–40. <http://doi.org/10.1002/bit.260250812>
- Tsezos, M., McCready, R. G., & Bell, J. P. (1989). The continuous recovery of uranium from biologically leached solutions using immobilized biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(1), 10–7. <http://doi.org/10.1002/bit.260340103>
- Tsezos, M., & Volesky, B. (1981). Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(3), 583–604. <http://doi.org/10.1002/bit.260230309>
- Tsezos, M., & Volesky, B. (1982). The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(2), 385–401. <http://doi.org/10.1002/bit.260240211>
- Tsuji, K., Asakawa, M., Anzai, Y., Sumino, T., & Harada, K. (2006). Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in an eutrophic lake. *Chemosphere*, 65(1), 117–124. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.018>
- Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M. F., Suzuki, S., Nakazawa, H., ... Harada, K. I. (1995). Stability of microcystins from cyanobacteria--II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 33(12), 1619–31. [http://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00101-8](http://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00101-8)
- Tsuruta, T. (2002). Removal and recovery of uranyl ion using various microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(1), 23–28. [http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80111-6](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80111-6)
- Tuğcu, M., Ruhi, C., Gokce, A. M., Kara, M., & Aksaray, S. (2016). A case of urinary tract infection caused by *Raoultella planticola* after a urodynamic study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.014>
- Turner, P. E., McBride, R. C., & Zeyl, C. W. (2009). Sexual Exploits in Experimental Evolution. In *Experimental evolution* (pp. 479–522).
- Tyerman, J., Havard, N., Saxer, G., Travisano, M., & Doebeli, M. (2005). Unparallel diversification in bacterial microcosms. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1570), 1393–1398. <http://doi.org/10.1098/rspb.2005.3068>
- Tyrrell, T. (2011). Anthropogenic modification of the oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 369(1938). <http://doi.org/10.1098/rsta.2010.0334>
- Underwood, A. J. (1998). Design, implementation, and analysis of ecological and environmental experiments. In W. J. Resetarits & J. Bernardo (Eds.), *Experimental ecology: issues and perspectives*. (pp. 325–349). Oxford: Oxford University Press.
- van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213–218. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2)
- Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1, 1–30.
- Vanderploeg, H., Liebig, J., Carmichael, W., Agy, M., Johengen, T., Fahnenstiel, G., &



- Nalepa, T. (2001). Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(6), 1208–1221.
- Vázquez-Campos, X., Kinsela, A. S., Collins, R. N., Neilan, B. A., Aoyagi, N., & Waite, T. D. (2015). Uranium Binding Mechanisms of the Acid-Tolerant Fungus *Coniochaeta fodinicola*. *Environmental Science & Technology*, 49(14), 8487–8496. <http://doi.org/10.1021/acs.est.5b01342>
- Vermeij, G. (2006). Historical contingency and the purported uniqueness of evolutionary innovations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1804–1809. <http://doi.org/10.1073/pnas.0508724103>
- Vesely, J., Norton, S. A., Skrivan, P., Majer, V., Kram, P., Navratil, T., & Kaste, J. M. (2002). Environmental Chemistry of Beryllium. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 50(1), 291–317. <http://doi.org/10.2138/rmg.2002.50.7>
- Vezie, C., Brient, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefeuvre, J.-C., & Salkinoja-Salonen, M. (1997). Occurrence of microcystin-containing cyanobacterial blooms in freshwaters of Brittany (France). *Archiv Für Hydrobiologie*, 139(3), 401–413.
- Vezie, C., Brient, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefeuvre, J.-C., & Salkinoja-Salonen, M. (1998). Variation of Microcystin Content of Cyanobacterial Blooms and Isolated Strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microbial Ecology*, 35(2), 126–135. <http://doi.org/10.1007/s002489900067>
- Vieira, R. H. S. F., & Volesky, B. (2010). Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology*, 3(1), 17–24. <http://doi.org/10.2436/IM.V3I1.9237>
- Vincent, T., & Brown, J. (2005). Evolutionary game theory, natural selection, and Darwinian dynamics.
- Visser, M. E. (2008). Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1635). <http://doi.org/10.1098/rspb.2007.0997>
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., & Melillo, J. M. (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*, 277(5325), 494–499. <http://doi.org/10.1126/science.277.5325.494>
- Vogel, M., Günther, A., Rossberg, A., Li, B., Bernhard, G., & Raff, J. (2010). Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH value and cell activity. *Science of The Total Environment*, 409(2), 384–395. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.011>
- Waal, F. De. (1997). The chimpanzee's service economy: food for grooming. *Evolution and Human Behavior*, 18(6), 375–386. [http://doi.org/10.1016/S1090-5138\(97\)00085-8](http://doi.org/10.1016/S1090-5138(97)00085-8)
- Wahl, L., & Krakauer, D. (2000). Models of experimental evolution: the role of genetic chance and selective necessity. *Genetics*, 156(3), 1437–1448.
- Walter, M. R., Buick, R., & Dunlop, J. S. R. (1980). Stromatolites 3,400–3,500 Myr old from the North Pole area, Western Australia. *Nature*, 284(5755), 443–445. <http://doi.org/10.1038/284443a0>

- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195–226. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>
- Wasylenki, L. E., Anbar, A. D., Liermann, L. J., Mathur, R., Gordon, G. W., Brantley, S. L., ... Brantley, S. L. (2007). Isotope fractionation during microbial metal uptake measured by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22(8), 905. <http://doi.org/10.1039/b705476a>
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 237–241. [http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00205-6](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00205-6)
- Waters, C. N., Zalasiewicz, J., Summerhayes, C., Barnosky, A. D., Poirier, C., Gálfuszka, A., ... Wolfe, A. P. (2016). The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science*, 351(6269). <http://doi.org/10.1126/science.aad2622>
- Weibel, E. R., & Bolender, R. (1973). Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In M. Hayat (Ed.), *Principles and Techniques of Electron Microscopy* (pp. 237–293). New York: Van Nostrand Reinhold CO.
- Wells, P., Lee, K., & Blaise, C. (1997). Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques, and practice.
- West, S. A., Diggle, S. P., Buckling, A., Gardner, A., & Griffin, A. S. (2007). The Social Lives of Microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 38, 53–77. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740>
- West, S. A., Fisher, R. M., Gardner, A., & Kiers, E. T. (2015). Major evolutionary transitions in individuality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10112–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1421402112>
- Westbroek, P., & Young, J. R. (1989). Coccolith production (biomineralization) in the marine alga *Emiliania huxleyi*. *Journal of Protozoology*, 36, 368–373.
- Whitfield, J. (2003). First ocean bacteria sequenced. *Nature News*. <http://doi.org/10.1038/news030811-6>
- Whiting, M. F., Bradler, S., & Maxwell, T. (2003). Loss and recovery of wings in stick insects. *Nature*, 421(6920), 264–267. <http://doi.org/10.1038/nature01313>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6578–83.
- Wihelm, C. (2002). Algal Adaptation to Environmental stress. *Journal of Plant Physiology*, 159, 561–565.
- Wilde, E. W., & Benemann, J. R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*, 11(4), 781–812. [http://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90003-6](http://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90003-6)
- Wilkinson, B. H. (2005). Humans as geologic agents: A deep-time perspective. *Geology*, 33(3), 161. <http://doi.org/10.1130/G21108.1>
- Williams, M. (1977). Stereological techniques. In A. M. Glanert (Ed.), *Practical*

- Methods in Electron Microscopy* (pp. 1–216). Amsterdam: North Holland/America Elsevier.
- Wilson, D. S., Van Vugt, M., & O’Gorman, R. (2008). Multilevel Selection Theory and Major Evolutionary Transitions. *Current Directions in Psychological Science*, 17(1), 6–9. <http://doi.org/10.1111/j.1467-8721.2008.00538.x>
- Wilson, E. O. (1975). *Sociobiology: The New Synthesis*. Cambridge: Harvard University Press.
- Woese, C. (1998). The universal ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6854–9.
- Woodruff, D. S. (2001). Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5471–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.101093798>
- World Nuclear Association. (2016a). Nuclear Power in Spain | Spanish Nuclear Energy. Retrieved from <http://www.world-nuclear.org/information-library/country-profiles/countries-o-s/spain.aspx>
- World Nuclear Association. (2016b). World Uranium Mining Production. Retrieved from <http://www.world-nuclear.org/information-library/nuclear-fuel-cycle/mining-of-uranium/world-uranium-mining-production.aspx>
- Yan, Z., Han, W., Peñuelas, J., Sardans, J., Elser, J. J., Du, E., ... Fang, J. (2016). Phosphorus accumulates faster than nitrogen globally in freshwater ecosystems under anthropogenic impacts. *Ecology Letters*, 19(10), 1237–46. <http://doi.org/10.1111/ele.12658>
- Yentsch, C., & Mague, F. (1980). Evidence of an apparent annual rhythm in the toxic red tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata*. *International Journal of Chronobiology*, 7, 77–84.
- Zalasiewicz, J., Williams, M., Haywood, A., & Ellis, M. (2011). The Anthropocene: a new epoch of geological time? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 369(1938).
- Závodská, L., Kosorínová-Lenk, -Eva, & Lesn, S.-J. (n.d.). Environmental chemistry of uranium.
- Zbinden, M., Haag, C. R., & Ebert, D. (2008). Experimental evolution of field populations of *Daphnia magna* in response to parasite treatment. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(4), 1068–1078. <http://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01541.x>
- Zhang, D., Xie, P., Liu, Y., & Chen, J. (2007). Bioaccumulation of the hepatotoxic microcystins in various organs of a freshwater snail from a subtropical Chinese lake, Taihu Lake, with dense toxic *Microcystis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 171–176. <http://doi.org/10.1897/06-222R.1>
- Zhang, X., Luo, S., Yang, Q., Zhang, H., & Li, J. (1997). Accumulation of uranium at low concentration by the green alga *Scenedesmus obliquus* 34. *Journal of Applied Phycology*, 9(1), 65–71. <http://doi.org/10.1023/A:1007911119029>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2004). A Greedy Algorithm for

Aligning DNA Sequences. *Http://www.liebertpub.com/cmb*.  
<http://doi.org/10.1089/10665270050081478>

- Zhou, W., Juneau, P., & Qiu, B. (2006). Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. *Chemosphere*, 65(10), 1738–1746.  
<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.078>
- Zhu, S., Zhu, M., Knoll, A. H., Yin, Z., Zhao, F., Sun, S., ... Liu, H. (2016). Decimetre-scale multicellular eukaryotes from the 1.56-billion-year-old Gaoyuzhuang Formation in North China. *Nature Communications*, 7, 11500.  
<http://doi.org/10.1038/ncomms11500>
- Zimba, P. V, Khoo, L., Gaunt, P. S., Brittain, S., & Carmichael, W. W. (2001). Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. *Journal of Fish Diseases*, 24(1), 41–47.  
<http://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00273.x>

## APÉNDICES



## APÉNDICE I

### IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN MOLECULAR

La identificación de la cepa bacteriana fue llevado a cabo por la CECT por medio de una amplificación por PCR del gen del 16S rRNA, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones) y análisis de las secuencias (Arahal, Sanchez, & Rovira, 2008).

Resultando en *Raoultella planticola*, con una semejanza de 1077/1077 pb (100%) sobre la secuencia AF129443 (cepa tipo ATCC 33531) (Drancourt et al., 2001).

En el caso de la cepa microalgal aislada, se llevó a cabo una amplificación por PCR en un termociclador Whatman Biometra® T-gradient. Los primers de oligonucleótidos utilizados corresponden a la zona del DNA ribosómico que comprende los espacios intergénicos ITS1 e ITS2 y que incluye el gen 5,8S (primers: TW81 (5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y AB28 (5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')) (Goff & Moon, 1993). A continuación, la extensión del primer se llevó a cabo utilizando una DNA *taq* polimerasa Amersham Pharmacia Biotech®, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones de la PCR fueron: precalentamiento a 97°C durante 5 minutos; 37 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1,25 minutos, hibridación de los primers a 60°C durante 2 minutos, extensión a 72°C y 4 minutos, y por último una extensión final de 7 min a 72°C. Posteriormente se llevó a cabo un análisis por electroforesis en un buffer TAE 1 % (p/v) y gel de agarosa, y se visualizó con luz UV tras una tinción con bromuro de etidio. Se utilizó un secuenciador ABI377 (Applied Biosystems®) usando un Kit BigDye terminator v3.0 cycle sequencing kit.

Resultando en *Chlamydomonas cf. fonticola*, siendo la especie a la cual más se aproximaba, con una semejanza de 388/447 pb (87%), sobre la secuencia HQ404897.1, cepa CCCryo 304-06 (Leya & Bey, 2010).





**APÉNDICE II**  
**TABLA DE URANIO BIOADSORCIÓN**

Biomasa <sup>a</sup>	Concentración de Uranio (mg/l)*	q <sup>b</sup> (mg/g biomasa seca)*	Estado biológico	Inmovilización	Referencia
(1) <i>Arthobacter nicotianae</i> Multi-especie	142 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	698	Viva/ Muerta	Suspensión/ Inmovilizadas	(Tsuruta, 2002)
(1) <i>Arthrobacter simplex</i>	n.s.	58	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(1) Consorcio microbiano de bacterias	100 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	218 ± 2	Vivas	Inmovilizadas	(Nancharaiah, Joshi, Mohan, & Narasimhan, Venugopalan, 2006)
(1) <i>Myxococcus xanthus</i>	0,1-0,3 mM [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	2.4 mM	Vivas/ Muertas	Suspensión	(González-Muñoz, Merroun, Ben Omar, & Arias, 1997)
(1) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	100	Viva/ Muerta	Suspensión	(Hu et al. 1996)
(1) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	100	Viva/ Muerta	Suspensión	(Hu et al. 1996)
(1) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CSU	100 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	5,36	Vivas	Inmovilizada	(Hu and Reeves 1997)
(1) <i>Pseudomonas fluorescens</i>	50-1000 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	6	Muertas	Suspensión	(Tsezos and Volesky 1981)
(1) <i>Pseudomonas saccharophila</i>	10 n.s.	87	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(1) <i>Pseudomonas sp</i>	100 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	541	Vivas/ Muertas	Suspensión/ Inmovilizadas	(Kazy, and D'Souza 2004)
(1) <i>Pseudomonas sp.</i>	100 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	202	Muertas	Inmovilizadas	(D'Souza, Sar, Kazy, & Kubal, 2006)
(1) <i>Pseudomonas sp.</i> EPS-5028	5-500 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	55	Vivas	Suspensión	(Marqués et al., 1991)
(1) <i>Pseudomonas sp.</i> EPS-5028	5-500 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	55	Vivas	Suspensión	(Marqués et al., 1991)
(1) <i>Pseudomonas sp.</i> EPS-5028	5-500 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	55	Vivas	Suspensión	(Marqués et al., 1991)
(1) <i>Streptomyces albus</i>	4 x 10 <sup>-5</sup> M [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	52-54	Vivas	Inmovilizadas	(Nakajima & Sakaguchi, 1986)
(1) <i>Streptomyces longwoodensis</i>	5-250 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	450	Vivas	Suspensión	(Friis & Myers-Keith, 1986)
(1) <i>Streptomyces niveus</i>	50-1000 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	40	Muertas	Suspensión	(Marios Tsezos & Volesky, 1981)
(1) <i>Streptomyces sp.</i>	0,7-10 mmol/l [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	150	Vivas/ Muertas	Suspensión	(Golab, Orlowska, & Smith, 1991)
(2) <i>Aspergillus flavus</i>	1mM [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	40	Muerta	Suspensión	(Hafez, Abdel-Razek, & Hafez, 1997)

(2) <i>Aspergillus fumigatus</i>	200-1000 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	170	Muertas	Suspensión	(Bhainsa & D'Souza, 1999)
(2) <i>Aspergillus niger</i>	n.s.	29	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(2) <i>Aspergillus niger</i>	n.s.	29	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(2) <i>Aspergillus niger</i>	n.s.	29	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(2) <i>Aspergillus niger</i> multi-especie	8.5-1000 UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	43	Muertas	Suspensión	(Kuyucak & Volesky, 1988)
(2) <i>Coniochaeta fodinicola</i>	0,5 mM UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	43	Muerta	Suspensión	(Vázquez-Campos et al., 2015)
(2) <i>Penicillium citrinum</i>	50 U <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	127,3	Muerta	Suspensión	(Pang et al., 2011)
(2) <i>Penicillium citrinum</i>	50 U <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	127,3	Muerta	Suspensión	(Pang et al., 2011)
(2) <i>Penicillium spp.</i>	n.s.	20,3	n.s.	n.s.	(McCready & Lakshamanan, 1986)
(2) <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	100–1000 UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	158.0	Muertas	Inmovilizadas	(Genç et al., 2003)
(2) Quitina de <i>Rhizopus arrhizus</i>	100 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	1-10	Muertas	Suspensión	(M Tsezos, 1983)
(2) <i>Rhizopus</i>	200-1000 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	180	Muertas	Suspensión	(Bhainsa & D'Souza, 1999)
(2) <i>Rhizopus arrhizus</i>	100 [U (VD)]	160	Muertas	Suspensión	(Tsezos and Volesky 1982)
(2) <i>Rhizopus arrhizus</i>	50-1000 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	180	Muertas	Suspensión	(Marios Tsezos & Volesky, 1981)
(2) <i>Rhizopus arrhizus</i>	200-500 uranio mineral	50	Muerta	Inmovilizada	(Tsezos, McCready, and Bell 1989)
(2) <i>Rhizopus arrhizus</i>	n.s.	34	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(2) <i>Rhizopus arrhizus</i>	n.s.	42,3	n.s.	n.s.	(McCready & Lakshamanan, 1986)
(2) <i>Talaromyces emersonii</i> CBS 814.70	15-300 [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]* <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	280	Vivas	Suspensión	(Bengtsson, Johansson, Hackett, McHale, & McHale, 1995)
(2) <i>Trametes versicolor</i>	100–1000 UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	309.1	Muertas	Inmovilizadas	(Genç et al., 2003)
(2) <i>Trichoderma harzianu</i>	1000 [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]* <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	612	Vivas/ Muertas	Suspensión	(Kalsoom Akhtar, Waheed Akhtar, & Khalid, 2007)

## Apéndices

(2) <i>Trichoderma harzianum</i>	100-1000 [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]*2H <sub>2</sub> O	80-95% eliminación	Vivas	Inmovilizadas	(Akhtar, Khalid, Akhtar, & Ghauri, 2009)
(3) Biomasa de la destilación del whisky	0.1-2 mM [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]*2H <sub>2</sub> O	160–170	Muertas	Inmovilizadas	(Bustard & McHale, 1997)
(3) <i>Kluyveromyces marxianus</i> IMB3	5-100 [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]*2H <sub>2</sub> O	115	Muertas	Suspensión	(Bustard, Donnellan, Rollan, McHale, & McHale, 1996)
(3) Levaduras de cerveza usadas	1mM [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O]	360	Muerta	Suspensión	(Riordan, Bustard, Putt, & McHale, 1997)
(3) Levaduras de cerveza usadas	1mM [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O]	360	Muerta	Suspensión	(Riordan et al., 1997)
(3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,1-0,5 mmol/l [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	2-4mmol U/g	Muerta	Suspensión	(Omar, Merroun, González-Muñoz, & Arias, 1996)
(3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	n.s.	12	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,1-0,5 mmol/l [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	2-4mmol U/g	Muerta	Suspensión	(Omar et al., 1996)
(3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	n.s.	12	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	n.s.	12	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> multi-especie	8.5-1000 UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	157	Muertas	Suspensión	(Kuyucak & Volesky, 1988)
(4) Cepas algas RD256 y RD257	1000 [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]*2H <sub>2</sub> O	354- 408	Vivas/ Muertas	Suspensión	(Akhtar et al., 2007)
(4) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	200nM [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	0.52 ± 0.07 mmol·m <sup>-2</sup>	Viva	Suspensión	(Fortin, Dutel, & Garnier-Laplace, 2004)
(4) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,1-0,6μM [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	6.5x10 <sup>-8</sup> M UO <sub>2</sub> 2p	Viva	Suspensión	(Lavoie, Sabatier, Garnier-Laplace, & Fortin, 2014)
(4) <i>Chlorella</i> sp.	n.s.	28,5	n.s.	n.s.	(Matson et al., 2006)
(4) <i>Chlorella regularis</i>	n.s.	3,96	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(4) <i>Chlorella regularis</i>	n.s.	3,96	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)
(4) <i>Chlorella regularis</i>	n.s.	3,96	n.s.	n.s.	(Sakaguchi & Nakajima, 1991)

(4) <i>Chlorella regularis</i>	2-10 [UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]*2H <sub>2</sub> O	15,6	Vivas /muerta	Suspensión	(Horikoshi et al., 1979)
(4) <i>Chlorella vulgaris</i>	0,005-1 mM UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	28.3 ± 0.6	Vivas /muerta	Suspensión	(Vogel et al., 2010)
(4) <i>Scenedesmus obliquus</i> 34	5,5 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	75	Vivas	Suspensión	(Zhang et al. 1997)
(4) <i>Scenedesmus sp</i>	n.s.	40,7	n.s.	n.s.	(Li et al. 2016)
(5) <i>Anacystis nidulans</i>	170.8 ± 3,4 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	85%	Muerta	Suspensión	(Liu & Wu, 1993)
(5) Cianobacteria bloom, <i>Microcystis aeruginosa</i>	40-600 [UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ].6 H <sub>2</sub> O	180	Muertas	Suspensión	( Li et al. 2004)
(5) <i>Synechococcus elongatus</i> BDU/75042	1M [UO <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	53.5	Vivas/ Muertas	Suspensión	(Acharya, Joseph, & Apte, 2009)

<sup>a</sup> 1 = bacteria; 2 = hongo; 3 = levadura; 4 = alga; 5 = cianobacteria. Multi-especie = más de una especie estudiada, se nombra la que más bio-acumula.

<sup>b</sup> Valor mayor de adsorción observado.

\* Valor con unidades indicadas, a no ser que se indique específicamente.

n.s. no encontrado.







**Esta tesis ha sido financiada por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad al conocerme una Ayuda para contratos predoctoral para la formación de doctores (BES-2014-067580), una ayuda de movilidad predoctoral (EEBB-I-16-10757) y el proyecto “Limpiando basura nuclear con microalgas: vivir recuperando y enriqueciendo uranio” (CTM2013-44366-R), del programa Retos de la Sociedad.**







**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Producción Animal**